

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

Ultraschnelle Spektroskopie an einzelnen Lichtsammelkomplexen von Purpurbakterien

Von der Universität Bayreuth
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

von

Stephan Wiesneth

aus Neumarkt i. d. OPf.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Köhler
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Lippitz

Tag der Einreichung: 17.04.2026

Tag des Kolloquiums: 30.07.2026

Summary

The high efficiency of photosynthetic processes in biological systems is based both on highly efficient energy transfer and on efficient relaxation processes within the energy landscape of pigment-protein complexes. The protein scaffold of such complexes offers a certain degree of flexibility, leading to structural and thus energetic differences and disorder. These fluctuations can occur on all time scales. It is already known that these fluctuations influence the relaxation of energies. In contrast, the excitonic states involved and the influence of vibration modes on the relaxation processes are critically discussed.

In this research project, individual peripheral light-harvesting complexes (LH2) of the purple bacteria *Rhodopseudomonas (Rps.) acidophila* and *Rps. palustris* are being investigated using ultrafast spectroscopy. In both cases, the complexes are pigment-protein complexes consisting of bacteriochlorophyll *a* molecules arranged in a double ring structure by a surrounding protein scaffold and additional carotenoids, with both rings exhibiting different coupling strengths between the chromophores due to their arrangement. However, the LH2 complexes of both species differ in their absorption behavior in the near-infrared spectral range.

In the experiments described here, the individual complexes are excited with coherent double pulses and the resulting fluorescence signal is recorded as a function of the time interval between the pulse pair. The excitation of the complexes and recording of the fluorescence signal takes place in a self-constructed fluorescence microscope, whereby the time interval and the phase relationship of the excitation pulses can be controlled with the aid of a pulse shaper and the implementation of spectral amplitude and phase masks.

Such excitation of the light-harvesting complexes generates two exciton wave packets that interfere with each other and thus influence the population of the emitting states.

This leads to a modulation of the fluorescence depending on the time interval between the pulse pairs. It can be seen that this modulation decays within approximately 100 fs due to the fluctuating microenvironment of the individual complexes, although this is distributed heterogeneously for the light-harvesting complexes observed.

In addition, it can be observed that the modulation behavior of individual complexes changes over a period of 60 s on a time scale of approximately 10 s, indicating changes in the energy relaxation paths toward low exciton states. These relaxations utilize the coupling between electronic states and low-frequency vibration modes.

Deutsche Zusammenfassung

Die hohe Effizienz photosynthetischer Prozesse in biologischen Systemen beruht sowohl auf hocheffizientem Energietransfer, als auch auf effizienten Relaxationsprozessen innerhalb der Energielandschaft von Pigment-Protein-Komplexen. Das Proteingerüst solcher Komplexe bietet eine gewisse Flexibilität, sodass es zu strukturellen und somit energetischen Unterschieden und Unordnungen kommt. Diese Fluktuationen können auf allen Zeitskalen auftreten. Dass diese Fluktuationen die Relaxation der Energien beeinflussen, ist bereits bekannt. Im Gegensatz dazu werden die beteiligten Exziton-zustände, sowie der Einfluss von Vibrationsmoden auf die Relaxationsprozesse kritisch diskutiert.

Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit werden individuelle periphere Lichtsammelkomplexe (LH2) der Purpurbakterien *Rhodopseudomonas (Rps.) acidophila* und *Rps. palustris* mittels ultraschneller Spektroskopie untersucht. In beiden Fällen handelt es sich bei den Komplexen um ringförmige Pigment-Protein-Komplexe, welche aus Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) Molekülen bestehen, die durch ein umgebendes Proteingerüst und zusätzliche Karotenoid-Moleküle in einer Doppelringstruktur angeordnet sind. Dabei weisen beide Ringe aufgrund der Anordnung unterschiedliche Kopplungsstärken zwischen den Chromophoren auf. Die LH2 Komplexe beider Spezies unterscheiden sich in ihrem Absorptionsverhalten im nahen Infraroten Spektralbereich.

Bei den hier beschriebenen Experimenten werden die einzelnen Komplexe mit kohärenten Doppelpulsen angeregt und das resultierende Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands des Pulspaars detektiert. Die Anregung der Komplexe und Aufnahme des Fluoreszenzsignals erfolgt mittels einem selbst konstruierten Fluoreszenzmikroskop, wobei der zeitliche Abstand, sowie die Phasenbeziehung der Anregungspulse mit Hilfe eines Pulsformers und einer Implementierung von spektralen Amplituden- und Phasenmasken kontrolliert wird.

Durch eine solche Anregung der Lichtsammelkomplexe werden zwei Exziton-Wellenpakete erzeugt, die miteinander interferieren und so die Population der emittierenden Zustände beeinflussen. Dies führt zu einer Modulation der Fluoreszenz in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands der Pulspaare. Es zeigt sich, dass diese Modulation aufgrund der fluktuierenden Mikroumgebung der individuellen Komplexe innerhalb ca. 100 fs abklingt, wobei sich dies für die beobachteten Lichtsammelkomplexe heterogen verteilt.

Zudem kann beobachtet werden, dass sich das Modulationsverhalten einzelner Komplexe über einen Zeitraum von 60 s auf einer Zeitskala von etwa 10 s ändert, was auf Änderungen der Energierelaxationspfade zu niedrigen Exzitonzuständen hinweist. Diese Relaxationen nutzen dabei die Kopplung zwischen elektronischen Zuständen und niederfrequenten Vibrationsmoden.

Inhaltsverzeichnis

Summary	i
Deutsche Zusammenfassung	iii
Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Photosynthese in Purpurbakterien	1
1.2 Periphere Lichtsammelkomplexe LH2	3
1.3 Kohärente Spektroskopie an LH2	6
1.4 Gliederung dieser Arbeit	8
2 Theoretische Grundlagen	11
2.1 Wechselwirkung von Molekülen mit Licht	11
2.2 Wechselwirkung zwischen zwei Chromophoren	17
2.3 Schwache Kopplung	19
2.4 Starke Kopplung	20
2.5 Spektroskopische Eigenschaften von LH2 Komplexen	22
3 Material und Methoden	25
3.1 Probenpräparation	25
3.2 Experimenteller Aufbau	26
3.3 Pulskompensation	29
3.4 Erzeugung phasenstarrer Pulspaare	31
3.5 Messmethode und Datenanalyse	33

4	Ultraschnelle Spektroskopie an LH2 der Spezies <i>Rps. acidophila</i>	37
4.1	Anregung der B800 und B850 Bande	37
4.1.1	Experimentelles	37
4.1.2	Ergebnisse	39
4.2	Anregung der B850 Bande	42
4.2.1	Experimentelles	42
4.2.2	Ergebnisse	42
4.2.3	Anregung der B850 Bande bei $\Omega_L = 860$ nm	45
5	Ultraschnelle Spektroskopie an LL LH2 der Spezies <i>Rps. palustris</i>	49
5.1	Experimentelles	49
5.2	Ergebnisse	51
6	Diskussion der Ergebnisse	55
6.1	Wellenpaket Interferenz in LH2 Komplexen	55
6.2	Spektrale Diffusion	60
7	Zusammenfassung und Ausblick	67
A	Anhang	69
A.1	Kalibrierung des SLM	69
A.2	Kalibration der Pixel-Position im Weitfeldbild	70
A.3	Überlapp-Berechnung	71
A.4	Fouriertransformation einzelner Fluoreszenzmodulationen	73
A.5	Zeitskalen der Energiefluktuationen	75
A.6	Spektrale Positionen der niedrigsten Exzitonzustände	77
	Literaturverzeichnis	80
	Danksagung	93
	Eidesstattliche Erklärung	97

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Photosynthetischen Einheit in den Membranen in Purpurbakterien.	2
1.2	Allgemeines Aufbauprinzip der peripheren Lichtsammelkomplexe von Purpurbakterien (LH2) am Beispiel des B800-B850 Komplexes der Spezies <i>Rps. acidophila</i>	4
1.3	B800 und B850 Absorptionsbanden der high-light und low-light LH2-Komplexe der Spezies <i>Rps. palustris</i>	6
2.1	Jablonski Diagramm eines willkürlichen Chromophors.	13
2.2	Mechanismen der homogenen und inhomogenen Linienverbreiterung. . .	16
2.3	Zustandsdiagramm zweier wechselwirkender Chromophore	18
2.4	Zustandsdiagramm für N miteinander wechselwirkenden Chromophoren	22
2.5	Absorptionsverhalten von BChl a Molekülen im Vergleich zu LH2 Komplexen.	23
3.1	Experimenteller Aufbau.	27
3.2	Multiphotonen-Intrapuls-Interferenz-Phasenscan und SHG Autokorrelation zweier Pulsspektren.	30
3.3	Pulsformung im Frequenzraum.	32
3.4	Prinzip der Datenanalyse.	35
4.1	Weitfeld Bild und zeitliches Fluoreszenzsignal einzelner Komplexe von <i>Rps. acidophila</i>	38
4.2	Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung beider Absorptionsbanden eines Ensembles und individuellen LH2-Komplexes der Spezies <i>Rps. acidophila</i>	40

4.3	Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies <i>Rps. acidophila</i> bei Anregung beider Absorptionsbanden.	41
4.4	Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung der B850 Bande eines Ensembles und individuellen LH2-Komplexes der Spezies <i>Rps. acidophila</i> .	43
4.5	Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies <i>Rps. acidophila</i> bei Anregung der B850-Bande. .	45
4.6	Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung der B850 Bande eines Ensembles und individueller LH2-Komplexe der Spezies <i>Rps. acidophila</i> für $\Omega_L = 860$ nm.	47
5.1	Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme und zeitliches Fluoreszenzsignal einzelner LL LH2 Komplexe von <i>Rps. palustris</i>	50
5.2	Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung eines Ensembles und individuellen LL LH2-Komplexes für <i>Rps. palustris</i>	52
5.3	Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies <i>Rps. palustris</i>	53
6.1	Interferenz von Exziton-Wellenpaketen in LH2-Komplexen	57
6.2	Änderung der Modulationsfrequenz eines individuellen Komplexes über fünf Messesequenzen hinweg, bei unterschiedlichen Anregungsbedingungen.	62
6.3	Änderung der Modulationsfrequenz eines individuellen Komplexes über fünf Messesequenzen hinweg für LH2 Komplexe unterschiedlicher Spezies.	63
A.1	Manuelle Kalibrierung der Beziehung zwischen LCD-Pixel und einfallender Wellenlänge.	70
A.2	Kalibrierung der Pixelpositionen in μm einer Weitfeldaufnahme	71
A.3	Beispiel einer Überlapp-Berechnung	72
A.4	Beispiel der Fourieranalyse eines individuellen LH2 Komplexes	74
A.5	Schematische Illustration der Mittelungen und verschiedenen Zeitskalen	76
A.6	Spektrale Positionen der niedrigsten Exzitonzustände individueller LH2 Komplexe der Spezies <i>Rps. acidophila</i>	77
A.7	Spektrale Abstände beobachteter Absorptionsbanden individueller LL LH2 Komplexe der Spezies <i>Rps. palustris</i>	78

Abkürzungsverzeichnis

2DES	Zwei-dimensionale elektronische Spektroskopie (engl.: <i>two-dimensional electronic spectroscopy</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
APD	Avalanche Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
BChl <i>a</i>	Bakteriochlorophyll <i>a</i>
CCD	Charge-Coupled Device
cps	Zählungen pro Sekunde (engl.: <i>counts per second</i>)
ESA	Excited State Absorption
FMO	Fenna–Matthews–Olson-Komplex
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FT	Fourier-Transformation
HL	Hohe Lichtintensität (engl.: <i>high light</i>)
IC	Interne Konversion (engl.: <i>internal conversion</i>)
ISC	Inter-System-Übergang (engl.: <i>inter-system crossing</i>)
LCOS	Flüssigkristall auf Silizium (engl.: <i>liquid crystal on silicon</i>)
LCD	Flüssigkristallanzeige (engl.: <i>liquid crystal display</i>)
LDAO	Lauryldimethylaminoxid
LH	Lichtsammelkomplex (engl.: <i>light-harvesting complex</i>)
LL	Geringe Lichtintensität (engl.: <i>low light</i>)
MIIPS	Multiphotonen-Intrapuls-Interferenz-Phasenscan (engl.: <i>multiphoton intrapulse interference phase scan</i>)

PSB	Phononen-Seitenbande (engl.: <i>phonon side band</i>)
RC	Reaktionszentrum (engl.: <i>reaction center</i>)
<i>Rps.</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
SLM	Räumlicher Lichtmodulator (engl.: <i>spatial light modulator</i>)
SPCM	Einzelphotonenzählmodul (engl.: <i>single photon counting module</i>)
Ti:Sa	Titan-dotierter Saphirkristall (engl.: <i>titanium-doped sapphire</i>)
TL	Transformationslimitiert (engl.: <i>transform-limited</i>)
TTL	Transistor-Transistor Logik
UV	Ultraviolett
WF	Weitfeld
ZPL	Null-Phononen-Linie (engl.: <i>zero-phonon line</i>)

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Photosynthese in Purpurbakterien

Photosynthese beschreibt den biologischen Prozess, bei welcher Lichtenergie der Sonne in biochemische Energie umgewandelt wird, um lebenswichtige Zellprozesse am Laufen zu halten. Der Prozess findet in vielen biologischen Organismen statt, z.B. in Pflanzen, Algen, Cyano-Bakterien oder Purpurbakterien. Die verschiedenen Organismen haben den photosynthetischen Prozess im Laufe der Evolution auf ihre jeweiligen natürlichen Umgebungen und Lichtbedingungen angepasst. Die Pigment-Moleküle des Antennensystems befinden sich in der Membran des Organismus und sind dort durch ein Proteingerüst räumlich positioniert. Auf diese Weise wird Lichtenergie effizient vom photosynthetischen Apparat aufgesammelt. Dabei spielen die angeregten Zustände der absorbierenden Chromophore eine wichtige Rolle, worauf in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen werden soll. Durch Energietransferprozesse wird die absorbierte Energie hin zu einem Reaktionszentrum geleitet, wobei das gesamte Antennensystem ähnlich einer Satellitenschüssel fungiert. Die Pigmente sind im Sinne eines energetischen Trichtersystems angeordnet, sodass die Energieniveaus der involvierten angeregten Zustände räumlich in Richtung des Reaktionszentrums abnimmt. Dies definiert die Orientierung des Energietransfers, welcher bevorzugt von höher zu niedriger energetischen Pigmenten stattfindet, somit wird die Energie in Richtung der Reaktionszentren geleitet [1–3]. Während dieser Vorgänge finden noch keine chemischen Prozesse statt. In den Reaktionszentren findet durch schnelle Prozesse eine Ladungstrennung statt, wobei ein Elektron eines angeregten Pigments an einen benachbarten Elektronenakzeptor abgegeben wird. Durch schnellen Elektronentransfer wird die Rekombination des entstandenen Ionen-Paares verhindert. In Zusammenhang mit der Protonenbewe-

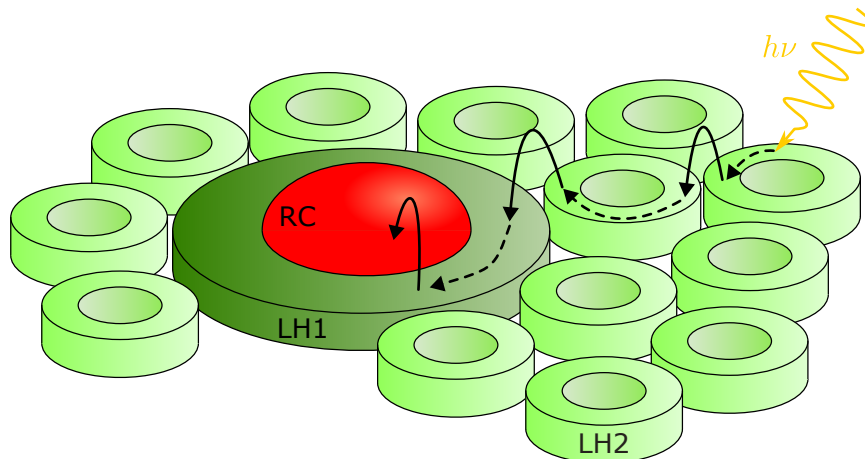


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Photosynthetischen Einheit in den Membranen in Purpurbakterien. Periphere Antennenkomplexe LH2 (hellgrün, kleine Ringe) absorbieren einfallendes Licht (gelb). Die Energie wird durch Energietransfer innerhalb einzelner Komplexe (schwarz gestrichelte Pfeile), sowie durch Transfer zwischen mehreren Komplexen (schwarz durchgezogene Pfeile) hin zu einem Kernkomplex LH1 (dunkelgrün, großer Ring) geleitet. Der Kernkomplex umschließt ein Reaktionszentrum (rot), wo es zur Ladungstrennung und weiteren chemischen Prozessen kommt.

gung entsteht dadurch ein pH-Gradient zwischen beiden Seiten der Membran, welcher zur Synthese von ATP genutzt wird [1].

Purpurbakterien sind anoxygene Phototrophe, die in den anaeroben Schichten stiller Gewässer, wie Seen oder Teiche, vorkommen [4, 5]. Der photosynthetische Apparat ist in der Membran der Bakterien enthalten und besteht aus zwei Arten von Pigment-Protein-Komplexen, den LH1 und LH2 Komplexen (*engl.: light-harvesting 1 & 2 complex*), welche wiederum aus Bakteriochlorophyllen, Karotenoiden und einem diese Pigmente umgebenden und in Position haltenden Proteingerüst bestehen. Jeder LH1-Komplex umschließt ein Reaktionszentrum und wird auch als Kernkomplex (RC-LH1) bezeichnet. Die LH2 Komplexe fungieren als periphere Antennenkomplexe, welche Lichtenergie absorbieren und mittels Energietransfer zu den LH1 Komplexen und somit zu den Reaktionszentren weiterleiten. Abbildung 1.1 illustriert den Sachverhalt graphisch. Licht trifft auf die Membran der Bakterien und wird von den peripheren Antennenkomplexen (LH2, hellgrün) absorbiert. Dies führt dazu, dass elektronische Zustände der LH2-Komplexe angeregt werden. Die Energie wird zu einem LH1-Komplex (dunkelgrün) transferiert. Dabei kommt es sowohl zu Intra-Komplex-Transfer, der nur innerhalb einzelner Lichtsammelkomplexe stattfindet (schwarze, gestrichelte Pfeile),

als auch zu Inter-Komplex-Transfer zwischen unterschiedlichen Komplexen (schwarze, durchgezogene Pfeile). Zuletzt wird die Energie zu einem Reaktionszentrum (RC, rot) geleitet. Ein solches besteht aus photoaktiven Pigmenten. Hier findet durch einen Oxidationsprozess eine Ladungstrennung statt, dadurch werden weitere chemische Prozesse, z.B. die Synthese von ADP zu ATP in Gang gesetzt [1–3, 6].

Der gesamte Energietransferprozess läuft auf einer Zeitskala von weniger als 100 ps ab und ist mit einer Quanteneffizienz von ca. 95 % höchst effizient [3]. Der Energietransfer der LH2-Komplexe läuft auf einer Zeitskala von 2-5 ps ab [7], während die Zeiten des Transfers von LH1 zu dem Reaktionszentrum eine Größenordnung höher anzusetzen ist [8, 9].

1.2 Periphere Lichtsammelkomplexe LH2

Antennen-Komplexe der einfachen Organismen der Purpurbakterien können als Modellsystem zur Entwicklung eines grundlegenden Verständnisses des photosynthetischen Lichtsammelprozesses auf molekularer Ebene dienen [1]. Die molekulare Struktur dieser Komplexe hängt von der bakteriellen Spezies, sowie von den Wachstumsbedingungen der jeweiligen Bakterien ab [10–17]. In Abbildung 1.2A ist der Aufbau eines einzelnen peripheren Lichtsammelkomplexes der Bakterienspezies *Rhodopseudomonas (Rps.) acidophila* beispielhaft dargestellt. Zwei transmembrane α - und β -Apoproteine schließen ein Karotenoid und drei Bakteriochlorophyll *a* (BChl *a*) Moleküle ein. Mehrere solcher $\alpha\beta$ Untereinheiten bilden eine ringförmige Struktur, den LH2-Komplex [14, 15, 17, 20, 21]. Im Falle der LH2-Komplexe von *Rps. acidophila* besteht ein solcher Ring aus neun Untereinheiten. Die BChl *a* Moleküle eines Komplexes lassen sich in zwei Pigment-Gruppen einteilen, die in zwei in Richtung der gemeinsamen Symmetrieachse zueinander verdrehten konzentrischen Ringen angeordnet sind. Die intermolekulare Wechselwirkung innerhalb der beiden Ringe unterscheiden sich stark voneinander. Ein Ring enthält BChl *a* Moleküle, die aufgrund ihres Abstands nur schwach miteinander wechselwirken (ein Chromophor pro Protomer), der zweite Ring enthält stark miteinander wechselwirkende BChl *a* Moleküle, die dichter beieinander positioniert sind (zwei Chromophore pro Einheitszelle). Dadurch können sich Exzitonzustände bilden, welche die spektroskopischen Eigenschaften der LH2-Komplexe definieren. In Abbildung 1.2B ist beispielhaft das Absorptionsspektrum eines Ensembles von LH2-Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* dargestellt, welches verschiedene charakteristische Absorptionsbanden aufweist. Bei etwa 500 nm ist die Absorptionsbande der Karotenoide zu

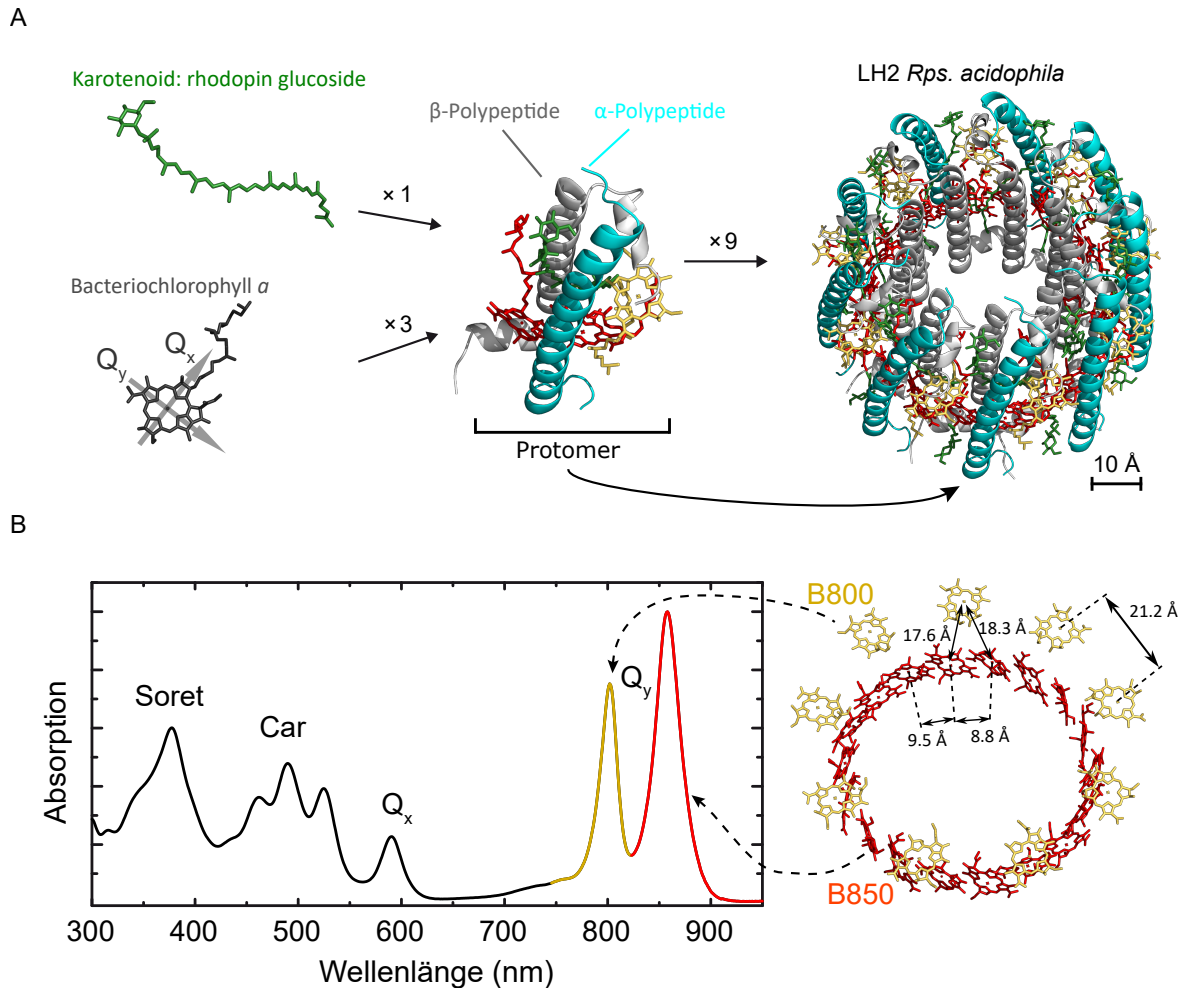


Abbildung 1.2: Allgemeines Aufbauprinzip der peripheren Lichtsammelkomplexe von Purpurbakterien (LH2) am Beispiel des B800-B850 Komplexes der Spezies *Rps. acidophila*. A) Ein Karotenoid-Molekül (hier: rhodospin glucoside) und drei BChl a Molekülen werden von zwei Apoproteinen (α -Polypeptid in blau, β -Polypeptid in weiß) umschlossen und bilden zusammen eine Einheitszelle (Protomer). Die unterschiedlichen Farben der BChl a Moleküle entspricht der Zugehörigkeit zu den B800 (gelb) und B850 (rot) Pigmenten. Neun Protomere formen in Ringstruktur den LH2 Komplex von *Rps. acidophila*. B) Absorptionsspektrum eines Ensembles von B800-B850 LH2 Komplexen. Die B800- und B850-Absorptionsbande sind in gelb und rot dargestellt. Die Anordnung der BChl a Moleküle im B800- (gelb) und B850-Ring (rot) ist zusammen mit den intermolekularen Distanzen in Å neben dem Spektrum dargestellt [18]. Abbildung nach [19].

erkennen. Bei LH2-Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* handelt es sich um das Karotenoid Rhodopin Glucoside, ein lineares Molekül mit alternierenden Doppelbindungen. Im nahen infraroten Bereich des Spektrums sind zwei Absorptionsbanden zu erkennen, die mit den BChl *a* Molekülen der zwei konzentrischen Ringen korrespondieren. Der schwach gekoppelte Ring zeigt sich in einer Absorptionsbande bei 800 nm, welche auch als B800-Bande bezeichnet wird. Der stark gekoppelte Ring ist Grund für eine Absorptionsbande um 850 nm, daher wird diese auch als B850-Bande bezeichnet. Darüber hinaus gibt es eine weitere Absorptionsbande im nahen UV Spektralbereich, die sogenannte Soret-Bande. Diese spiegelt einen elektronischen Übergang in höhere angeregte Zustände der BChl *a* Moleküle wider.

Die Proteinmatrix der LH2-Komplexe kann wie eine dielektrische Umgebung für die Chromophore verstanden werden. Diese Matrix fluktuiert auf allen Zeitskalen und beeinflusst so auch die angeregten Zustände und damit die spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente im Proteinkomplex.

Das in Abbildung 1.2B gezeigte Absorptionsspektrum wird oft als „Standard LH2 Spektrum“ bezeichnet. In der Literatur findet man jedoch häufig Abweichungen dieses Musters [4], diese abweichenden Formen werden meist als LH3 oder LH4 Komplexe bezeichnet. Bakterien der Spezies *Rps. acidophila*, welche unter geringen Lichtbedingungen gewachsen sind, bilden ebenfalls LH2-Komplexe mit einer neun-zähligen Ringstruktur aus, jedoch weist das Absorptionsspektrum der peripheren Antennenkomplexe eine blau-verschobene B850-Absorptionsbande auf. Aus diesem Grund werden diese Antennenkomplexe in der Literatur als LH3 oder B800-820 Komplex bezeichnet [10].

Ein weiteres Beispiel stellen LH2-Komplexe der Bakterienspezies *Rps. palustris* dar [22, 23]. Antennenkomplexe von Bakterien, die unter high-light (im Folgenden abgekürzt mit HL) Bedingungen gezüchtet worden sind, weisen die gleichen spektralen Eigenschaften im nahen Infrarotbereich auf, wie die in Abbildung 1.2B gezeigten Eigenschaften der Spezies *Rps. acidophila*. Die Absorptionsbanden von *Rps. palustris* LH2 Komplexen, welche unter low-light (im Folgenden abgekürzt mit LL) Bedingungen gewachsen sind, weisen hingegen Unterschiede auf. So ist hier weiterhin eine Bande bei 800 nm, sowie eine schwache Absorptionsbande bei 850 nm (siehe Abbildung 1.3). Zudem ist eine erhöhte Absorption bei 820 nm festzustellen. Für LH2-Komplexe der Spezies *Rps. palustris* wird daher von einer heterogenen Zusammensetzung der $\alpha\beta$ -Apoproteine ausgegangen. Der Ring setzt sich ebenfalls aus neun Untereinheiten zusammen, jedoch besitzen die BChl *a* Pigmente im B850-Ring unterschiedliche Eigenschaften. Sechs der $\alpha\beta$ -Untereinheiten weisen B820-Eigenschaften auf, während drei Einheitszellen B850-

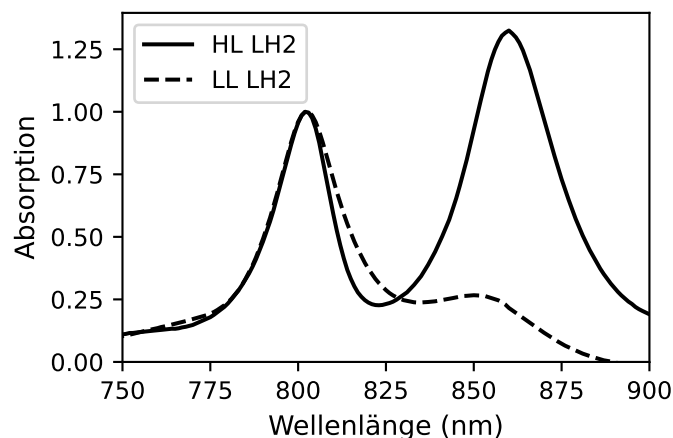


Abbildung 1.3: B800 und B850 Absorptionsbanden der high-light und low-light LH2-Komplexe der Spezies *Rps. palustris*. Die Absorptionsspektren sind auf das Maximum der B800 Bande normiert. HL LH2 (durchgezogene Linie) zeigt eine hohe Absorption bei ca. 860 nm, während das Maximum dieser Bande der LL LH2 (gestrichelte Linie) schwächer ausgeprägt und zu etwa 850 nm verschoben ist.

Eigenschaften besitzen [12].

Aus diesem Grund werden im Folgenden LH2 Komplexe, welche das „Standard Spektrum“ aufweisen als B800-B850 LH2 bezeichnet. Andere Komplexe werden entsprechend der spektralen Positionen der Absorptionsbanden benannt. Falls das keine Abgrenzung liefert werden die Komplexe mit dem Zusatz low-light (LL) oder high-light (HL) benannt, entsprechend der Wachstumsbedingungen der jeweiligen Purpurbakterien.

1.3 Kohärente Spektroskopie an LH2

In vorangegangenen Forschungsarbeiten sind durch nicht-lineare Messmethoden, wie zweidimensionale elektronische Spektroskopie (engl.: 2-dimensional electronic spectroscopy, 2DES), an verschiedenen Lichtsammelkomplexen (FMO, LH2, ...) langlebige Quantenkohärenzen beobachtet worden, deren Ursprung nicht gänzlich geklärt ist. Mit der Beobachtung dieser Kohärenzen stellte sich zusätzlich die Frage, inwiefern diese eine Bedeutung in der Lichtsammelfunktion besitzen [24–31]. In einem ungestörten System (ohne zeitabhängige energetische Unordnung durch Fluktuationen der Proteinmatrix) herrscht perfekte Kohärenz, dadurch kommt jedoch kein effektiver Energietransfer zustande. Auf der anderen Seite entstehen durch zu große Unordnung energetische Fal-

len, welche effizienten Energietransfer hin zu einem Reaktionszentrum verhindern. Für einen optimalen Ablauf des Lichtsammelprozesses in der biologischen Photosynthese ist folglich beides, Kohärenz und Dekohärenz, nötig [32–35].

Mit Hilfe von 2DES können viele dynamische Prozesse auf kurzen Zeitskalen beobachtet werden [24–31, 34, 36, 37]. Zur Untersuchung der nicht-linearen Signale höherer Ordnung sind jedoch sehr hohe Anregungsleistungen notwendig. Des Weiteren sind zusätzliche Signale vorhanden, wie beispielsweise die Absorption der angeregten Zustände (engl.: excited state absorption, ESA) oder Raman-Übergänge, welche Schwingungs-Wellenpakete im Grundzustand induzieren. Diese erschweren es, aus dem gemessenen Signal Rückschlüsse über den Ursprung der Kohärenzen der für den Lichtsammelprozess wichtigen niederenergetischen Exziton-Zustände zu ziehen, welche von elektronischer oder vibronischer Natur sein können. Zudem werden durch Messungen an Ensemble-Proben ultraschnelle Prozesse in den Komplexen weggemittelt. Daher können Fluktuationen der Relaxationspfade auf einer Zeitskala von mehreren Sekunden, aufgrund von Konformationsänderungen des Proteingerüsts, mit 2DES nicht aufgelöst werden [38–44].

Durch die Kombination von Einzelmolekülspektroskopie und ultraschneller Spektroskopie können die oben beschriebenen Umstände umgangen und die Dynamiken der Exziton-Zustände individueller Lichtsammelkomplexe beobachtet werden [45, 46]. Erste Experimente an einzelnen LH2-Komplexen sind in der Gruppe von Prof. Dr. Niek van Hulst in Barcelona durchgeführt worden [47]. Diese konzipierten eine Zwei-Farben-Doppelpuls-Anregung, einem ersten Anregungspuls, welcher resonant mit der B800-Bande ist, gefolgt von einem zweiten Puls, der wiederum (quasi-)resonant mit der B850-Bande ist, und der eine feste Phasenbeziehung zu dem ersten Puls besitzt. Die Population des angeregten LH2-Systems wurde durch das Fluoreszenzsignal detektiert. Es konnte eine Modulation des Signals in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der beiden Anregungspulse beobachtet werden, welche mit einer elektronischen Quantenkohärenz zwischen den B800- und B850-Zuständen in Verbindung gebracht wurde. Zusätzlich konnte eine Änderung der Fluoreszenzmodulation auf einer Zeitskala von mehreren Sekunden beobachtet werden. Diese wurden auf Änderungen des Relaxationspfades aufgrund von Konformationsänderungen der Proteinmatrix einzelner LH2-Komplexe zurückgeführt. In späteren Forschungsarbeiten wurden Fluktuationen der Relaxationszeiten auf ähnlich langen Zeitskalen beobachtet [45].

1.4 Gliederung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) werden die Interferenz von Exziton-Wellenpaketen sowie die Anpassung von Energie-Relaxationspfaden in einzelnen LH2-Komplexen der Bakterienspezies *Rps. acidophila* und *Rps. palustris* detailliert dargestellt und analysiert. Dazu wurde ein optischer Messplatz zur Messung von fluoreszenz-detektierter ultraschneller Spektroskopie entwickelt und aufgebaut.

Nach einer Einführung in die photosynthetischen Prozesse der Purpurbakterien und den peripheren Lichtsammelkomplexen in Kapitel 1, werden in Abschnitt 2 die grundlegenden theoretischen Aspekte dargelegt, die zum Verständnis der Messungen und deren Ergebnisse notwendig sind. Dabei wird zunächst auf die photophysikalischen Eigenschaften einzelner Moleküle eingegangen und anschließend die Wechselwirkung mehrerer Chromophore miteinander erläutert. Hierbei wird auch der Bezug zu den in dieser Arbeit untersuchten LH2-Komplexen gezogen.

In Kapitel 3 werden die experimentellen Methoden aufgezeigt. Zunächst wird die Präparation der vermessenen Proben beschrieben. Anschließend wird der optische Aufbau des entwickelten Fluoreszenz-Mikroskops dargelegt und vor allem auf die Besonderheit der breitbandigen Anregungsquelle und des Pulsformers zur individuellen Formung der Anregungspulse eingegangen. In diesem Zusammenhang werden nachfolgend die Methoden zur Pulskompensation zur Gewährleistung von ultrakurzen Anregungspulsen, als auch die Methode zur Erzeugung phasenstarrer Doppelpulse mit Hilfe des Pulsformers vorgestellt. Abschließend wird die Signalverarbeitung und die Analyse der erhobenen Daten genauer betrachtet.

Kapitel 4 präsentiert die Messergebnisse der Experimente an peripheren Lichtsammelkomplexen der Spezies *Rps. acidophila*. Im Speziellen wird auf die experimentellen Parameter der jeweiligen Messungen eingegangen und die resultierenden Ergebnisse dargestellt. Dabei wird unterschieden zwischen Experimenten, bei denen das Spektrum der Anregungspulse mit beiden Absorptionsbanden B800 und B850 überlappt, und Messungen, bei denen nur die B850-Bande angeregt wird.

Die experimentellen Parameter und resultierenden Ergebnisse der Messungen an LL LH2-Komplexen der Spezies *Rps. palustris* finden sich in Kapitel 5 wieder. Hier wurde die Anregung beider Absorptionsbanden untersucht.

Die Beobachtungen der beiden vorangegangenen Kapiteln werden in Kapitel 6 diskutiert und näher untersucht. Dabei werden zunächst die Ursprünge der beobachteten Fluoreszenzsignale besprochen. Im Anschluss wird genauer auf die Veränderungen der Beobachtungen auf einer Zeitskala von mehreren Sekunden eingegangen und Rückschlüsse auf die physikalischen Prozesse in LH2 Komplexen gezogen.

Zuletzt werden noch einmal alle aus den Beobachtungen und Diskussionen gewonnenen Erkenntnisse in Kapitel 7 zusammengefasst. Die Arbeit schließt mit einem Ausblick auf weitere, im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelte Aspekte.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel befasst sich mit den photophysikalischen Eigenschaften von Molekülen und der zugrundeliegenden Theorie. Dabei soll zunächst auf das Verhalten von einzelnen Molekülen bei Wechselwirkung mit Licht eingegangen werden. Ein weiterer Teil befasst sich mit der Interaktion zwischen mehreren Molekülen und den resultierenden neuen Eigenschaften, wie Energietransfer und Aggregation. Dies wird schließlich explizit am Beispiel von LH2-Komplexen aufgezeigt.

2.1 Wechselwirkung von Molekülen mit Licht

Die Interaktion von eingestrahlttem Licht mit absorbierenden Chromophoren stellt einen zentralen Punkt dieser Arbeit dar.

Absorption oder Emission eines Photons durch ein Moleküle entspricht dem Übergang zwischen einem Grund- und einem angeregten Zustand des Moleküls. Diese in erster Näherung stationären Zustände werden durch Wellenfunktionen $|\Psi\rangle$ beschrieben und sind Lösungen der zeitunabhängigen Schrödinger Gleichung:

$$\hat{H} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle \quad (2.1)$$

$\hat{H}$ entspricht bei einem Molekül dem Viel-Körper-Hamiltonoperator, welcher alle Potentiale und kinetischen Energien beschreibt, die im System auftreten [48]. Organische Moleküle lassen sich durch die Bewegung und Wechselwirkung der involvierten Kerne und Elektronen beschreiben, daher setzt sich der Hamiltonoperator wie folgt zusammen:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_K + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{eK} + \hat{V}_{KK} \quad (2.2)$$

Die Indizes e und K stehen hierbei entsprechend für die Elektronen bzw. Kerne. $\hat{T}_e$ und $\hat{T}_K$ stellen in Gl.(2.2) die kinetischen Energien der Elektronen und Kerne dar. Die Wechselwirkungen zwischen den Teilchen werden durch die Potentiale $\hat{V}_{ee}$ für Elektron-Elektron-, $\hat{V}_{eK}$ für Elektron-Kern- und $\hat{V}_{KK}$ für Kern-Kern-Interaktionen beschrieben. Um Gl.(2.1) unter diesen Bedingungen lösen zu können, muss es sich um ein sehr einfaches System, wie dem Wasserstoffatom (ein Kern und ein Elektron) handeln. Schon für das nächst kompliziertere System eines H_2^+ -Moleküls (zwei Kerne und ein Elektron) ist eine genaue Lösung nicht mehr möglich.

Aus diesem Grund werden die Adiabatische Näherung, sowie die Born-Oppenheimer-Näherung angewandt [48]. Hierbei beachtet man die um viele Größenordnungen höhere Masse der Kerne im Vergleich zu den leichteren Elektronen. Dies lässt die getrennte Betrachtung der Bewegung von Elektronen und Kernen zu. Die räumliche Position der Kerne kann in erster Näherung als konstant angenommen werden, wohingegen die Bewegung der Elektronen den Kernschwingungen folgt. Somit lässt sich die Gesamtwellenfunktion $|\Psi\rangle$ in einen rein elektronischen Anteil $|\psi_{el}\rangle$ und einen weiteren Teil $|\psi_{vib}\rangle$, der die Schwingungen der Kerne beschreibt, aufteilen:

$$|\Psi\rangle = |\psi_{el}\psi_{vib}\rangle \quad (2.3)$$

Bei der Wechselwirkung des Systems mit elektromagnetischer Strahlung kann ein Molekül vom Grundzustand in den angeregten Zustand wechseln. Quantenmechanisch kann dies als kleine Störung des Systems betrachtet werden. Zur Bestimmung der Rate eines solchen Übergangs wird daher eine zeitabhängige Störungsrechnung durchgeführt.

Die eingestrahlte elektromagnetische Welle wird als Störungsterm $\hat{H}'(t)$ zum zeitunabhängigen Hamiltonoperator des ungestörten Systems $\hat{H}_0$ hinzu addiert:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}'(t), \quad (2.4)$$

für die kleine Störung gilt dabei:

$$\hat{H}'(t) = -\mathbf{E}(t) \cdot \hat{\boldsymbol{\mu}} = -\mathbf{E}(t) \cdot e\hat{\mathbf{r}} \quad (2.5)$$

Hier entspricht $\mathbf{E}$ dem eingestrahnten elektromagnetischen Feld, $\hat{\boldsymbol{\mu}} = e\hat{\mathbf{r}}$ beschreibt den Dipoloperator, mit der Elementarladung e und dem Abstandsvektor $\mathbf{r}$. In der Dirac-Notation lassen sich der stationäre Hamilton-Operator, sowie der Störungsterm wie folgt ausdrücken:

$$\hat{H}_0 = H_n |S_n, \nu\rangle \langle S_n, \nu| \quad (2.6)$$

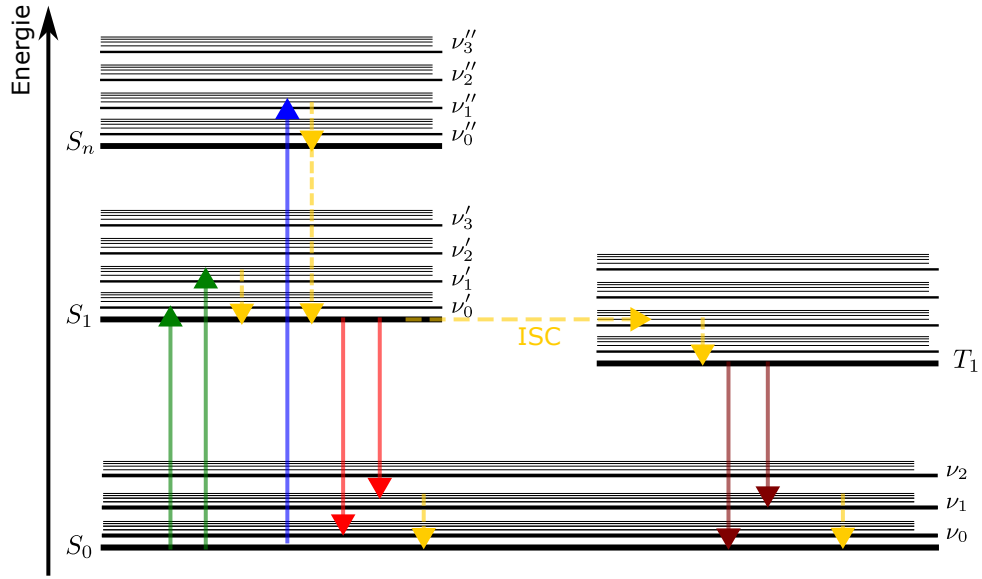


Abbildung 2.1: Jablonski Diagramm eines willkürlichen Chromophors. Die stationären Zustände mit ihren Vibrationszuständen, sowie den Phononen-Seitenbanden sind als schwarze horizontale Linien eingezeichnet. Übergänge zwischen den Zuständen werden durch vertikale Pfeile beschrieben, dabei stellen grüne Pfeile Absorptionsvorgänge, hellrote Fluoreszenzemission und dunkelrote Phosphoreszenzemission dar. Der blaue Pfeil referenziert Anregungen in höhere angeregte Zustände. Gelbe gestrichelte Pfeile bilden strahlungslose Übergänge, wie interne Konversion oder ISC ab. Details siehe Text.

$$\hat{H}' = H_{nm} |S_n, \nu_i\rangle \langle S_m, \nu'_j| \quad (2.7)$$

Dabei entsprechen $S_{n \neq m}$ stationären Zuständen des System, H_n spiegelt die Eigenenergie eines solchen Zustands wieder, H_{nm} beschreibt die Energie des Wechselwirkungsfeldes. Zusätzlich sind die Vibrationszustände der entkoppelten Wellenfunktionen ν_i bzw. ν'_j , wobei i und j den Vibrationszustand eines elektronischen Zustands ausdrücken, der Apostroph teilt den Vibrationszustand dem entsprechenden elektronischen Zustand zu.

Übergänge zwischen den verschiedenen elektronischen Zuständen können durch ein Jablonski-Diagramm, wie in Abbildung 2.1 für ein beliebiges Chromophor, dargestellt werden. Das Diagramm stellt elektronische Zustände als durchgezogenen Linien dar, in diesem Beispiel sind ein Grundzustand (S_0), sowie mehrere angeregte Singulett Zustände zu sehen. Hier drückt S_1 den ersten angeregten Singulettzustand aus, während S_n beliebig höhere Singulettzustände repräsentiert. Jeder elektronische Zustand besitzt Vibrationsunterzustände (ν), wie bereits in Gl.(2.3) suggeriert, die in Abbildung 2.1

durch feinere horizontale Linien dargestellt. Diese visualisieren die Energiezustände der Molekülschwingungen. Zusätzlich sind Wechselwirkungen des Moleküls mit der Umgebung durch Phononen-Unterzustände als weitere feine horizontale Linien oberhalb der Schwingungsniveaus dargestellt, diese drücken sich z.B. durch schnelle Fluktuationen und Schwingungen von Proteinen, welche das Molekül umgeben. Die durchgezogenen Pfeile von Grund- in einen angeregten Zustand (grün), bzw. vom ersten angeregten Zustand in den Grundzustand (hellrot) entsprechen den strahlenden Übergängen der Absorption bzw. Fluoreszenz. Strahlende Übergänge finden aufgrund von Kashas Regel immer aus dem energetisch tiefsten Niveau des Grundzustands oder des angeregten Zustands statt [49]. Im Gegensatz zu den strahlenden Übergängen werden nicht-strahlende Übergänge mit gestrichelten Pfeilen veranschaulicht. Hierbei kann es sich um Relaxationsvorgänge, bei denen kein Photon emittiert wird, z.B. aus den höheren Vibrationsniveaus in das tiefste Vibrationsniveau eines angeregten Zustands handeln. Dies wird aus dem Englischen auch als *Internal Conversion* (IC) bezeichnet [50]. Energietransfer von einem Molekül zu einem benachbarten stellt einen weiteren strahlungslosen Übergang dar. Ergänzend ist der Übergang durch *Inter-System Crossing* (ISC) hin zu einem angeregten Triplettzustand des Chromophors abgebildet.

Ein solcher Triplettzustand besitzt eine Spin-Quantenzahl von 1, während die Spin-Quantenzahlen von Singulett-Zuständen 0 beträgt. Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Spin-Quantenzahlen sind optisch verboten, jedoch können durch Spin-Orbit Kopplung Wellenfunktionen der Triplett-Zustände Singulett-Anteile erhalten und umgekehrt [51]. Dadurch sind Übergänge zwischen dem ersten angeregten Triplett-Zustand und dem Grundzustand möglich (dunkelrote Pfeile in Abbildung 2.1).

Für einen rein elektronischen Übergang (ohne weitere Wechselwirkung des Chromophors mit der Umgebung) folgt aus der Unschärferelation [52]:

$$\Delta\nu\Delta t < 1 \quad (2.8)$$

dass die Linienbreite des Übergangs durch die natürliche Lebensdauer τ_1 bestimmt wird. Da es sich bei einem solchen Übergang um einen exponentiellen Zerfall handelt, entspricht die Linienform im Energiespektrum einer Lorentzkurve, mit der homogenen Linienbreite:

$$\Gamma_{hom} = \frac{1}{2\pi\tau_1} \quad (2.9)$$

Diese Linienbreite wird auch als *Zero Phonon Line* (ZPL) bezeichnet, da in dieser Betrachtung noch keine Wechselwirkung mit Phononen stattgefunden hat [53]. Die

Kopplung des Chromophors an eine schnell fluktuierende Umgebung (und damit die Wechselwirkung des Systems mit Phononen) hat eine Dephasierung der Zustände und somit eine homogene Verbreiterung der Absorptionslinie zur Folge [54]:

$$\Gamma_{hom} = \frac{1}{2\pi\tau_1} + \frac{1}{\pi\tau_2^*(T)} \quad (2.10)$$

wobei τ_2^* auch als *reine Dephasierungszeit* bezeichnet wird, die temperaturabhängig ist [55, 56]. Bei einer linearen Elektron-Phonon-Kopplung gibt es zudem Übergänge in die Phononenzustände der elektronischen Zustände. Dies drückt sich im Energiespektrum durch eine Phononenseitenbande (engl.: *phonon side band*, PSB) aus [56]. Der Debye-Waller Faktor α_{DW} beschreibt dabei das Verhältnis zwischen der Intensität der Null-Phononen-Linie und der Phononen-Seitenbande:

$$\alpha_{DW} = \frac{I_{ZPL}}{I_{ZPL} + I_{PSB}} = e^{-S} \quad (2.11)$$

und ist mit dem Huang-Rhys Faktor S verknüpft [57]. Bei einem Faktor von $S \ll 1$ spricht man von schwacher Elektron-Phonon-Kopplung, die Phononen-Seitenbande (rote Linie in Abbildung 2.2A) ist schwächer ausgeprägt, als die Null-Phononen-Linie (blaue Linie). Dies lässt sich bei Tieftemperatur-Experimenten beobachten [19, 58]. Im Vergleich dazu dominiert die PSB für einen großen Huang-Rhys Faktor $S \gg 1$ (Abbildung 2.2B). Dies kann bei hohen Temperaturen des Systems beobachtet werden.

Neben diesen homogenen Verbreiterungsmechanismen, können durch langsame Fluktuationen des Systems auch inhomogene Verbreiterungen einer Spektrallinie stattfinden. Ein solcher Mechanismus ist bei der Beobachtung eines Ensembles von Chromophoren zu erkennen. Da jedes Molekül eines solchen Ensembles durch die Wechselwirkung mit seiner Mikroumgebung eine eigene spektrale Verschiebung erfahren kann, ist im Experiment eine verbreiterte Absorptionsbande zu sehen [57]. Dieser Sachverhalt ist auch in Abbildung 2.2C dargestellt, die grauen Einzellinien stellen die Absorption der individuellen Chromophore da, welche sich zu einer inhomogen verbreiterten schwarzen Absorptionslinie des Ensembles aufsummieren.

Aufgrund von dynamischen Fluktuationen der Umgebung eines einzelnen Chromophors und der damit zeitlich variierenden Wechselwirkung, kann sich der Übergang auch zeitlich spektral verschieben. Hierbei spricht man auch von dynamischer Unordnung des Systems. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen, wie zeitliche Integration des Messsignals, führt dies ebenfalls zur inhomogenen Verbreiterung der Spektrallinie. In

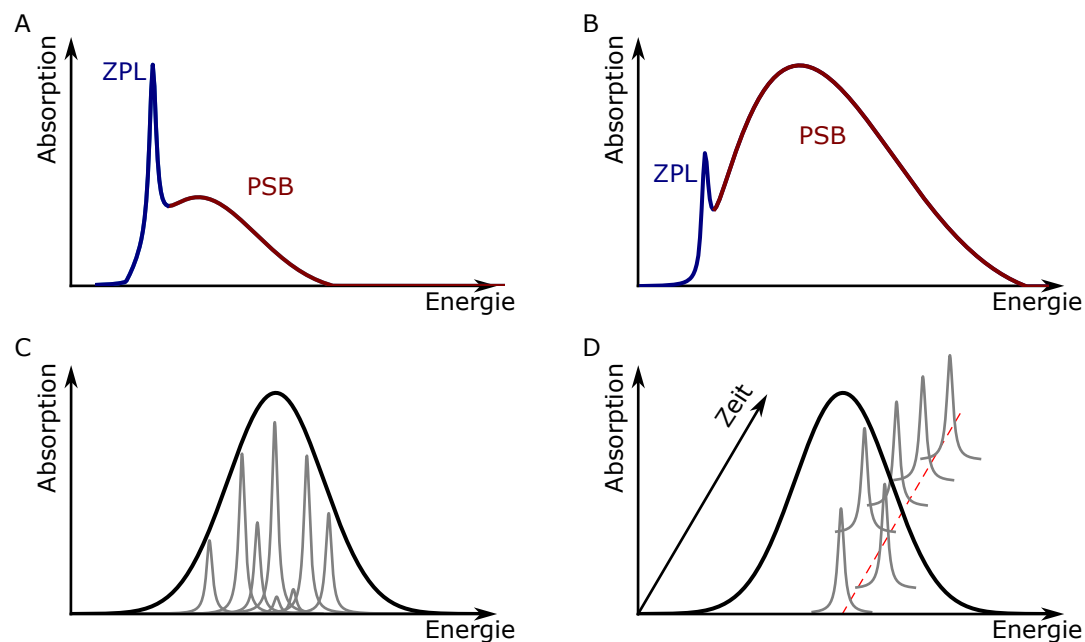


Abbildung 2.2: Mechanismen der homogenen und inhomogenen Linienverbreiterung. Homogene Linienverbreiterung bei A) niedrigen und B) hohen Temperaturen. Die Intensität der Null-Phononen-Linie (ZPL) ist in blau, die Intensität der Phononen-Seitenbande in rot dargestellt. C) Inhomogene Verbreiterung in einem Ensemble (schwarz) von einzelnen Komplexen (grau), die alle unterschiedliche Wechselwirkung mit ihrer Mikroumgebung erfahren. D) Inhomogene Verbreiterung in einem individuellen Komplex durch zeitliche spektrale Diffusion des Übergangs (grau). Während eines Messvorgangs wird über alle spektralen Positionen des Übergangs innerhalb der Integrationszeit gemittelt.

Abbildung 2.2D ist zu sehen wie die Absorptionslinie eines einzelnen Chromophors (grau) mit der Zeit statistisch um einen Mittelwert (rote Linie) fluktuiert. Die zeitliche Mittelung des Signal entspricht der schwarzen Kurve. Eine solche zeitliche Veränderung der spektralen Position bezeichnet man auch als spektrale Diffusion [53].

In Bezug auf das im Rahmen dieser Arbeit betrachtete System der LH2 Komplexe, beschreibt die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit einzelnen Chromophoren die Absorption und Emission der individuellen Bakteriochlorophylle des Pigment-Protein-Komplexes. Die Übergänge vom Grundzustand in die angeregten Singulett-Zustände, wie im Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1) dargestellt, zeigen sich im Absorptionsspektrum (vgl. Abbildung 1.2) an den Q_x - und Q_y -Banden, sowie den Soret-Banden im UV-Bereich des Spektrums (Übergang in höhere angeregte Zustände)

2.2 Wechselwirkung zwischen zwei Chromophoren

Im vorherigen Abschnitt wurde die Wechselwirkung eines einzelnen Chromophors mit Licht behandelt. Im Rahmen dieser Arbeit werden multichromophore Pigment-Protein Komplexe untersucht, bei denen einzelne Chromophore in einem Proteingerüst mit anderen Molekülen wechselwirken können. Daher sollen im Folgenden auf die Effekte solcher Interaktionen zunächst zweier Übergangsdipolmomente eingegangen werden.

Die Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen stellt einen zusätzlichen Term im gesamten Hamiltonoperator des Systems dar, welcher bereits die Hamiltonoperatoren der beiden nicht miteinander wechselwirkenden Moleküle $\hat{H}_1$ und $\hat{H}_2$ enthält [51, 59]:

$$\hat{H} = E_1 |1\rangle \langle 1| + E_2 |2\rangle \langle 2| + J_{12} |1\rangle \langle 2| \quad (2.12)$$

Der zusätzliche Term $J_{12} |1\rangle \langle 2|$ beschreibt die Kopplung zwischen den Molekülen 1 und 2 mit den Wellenfunktionen und Eigenenergien $|1\rangle$ und E_1 bzw. $|2\rangle$ und E_2 . Für die Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente kann eine Punkt-Dipol-Näherung angenommen werden:

$$J_{nm} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \left[\frac{\boldsymbol{\mu}_n \cdot \boldsymbol{\mu}_m}{R_{nm}^3} - 3 \frac{(\boldsymbol{\mu}_n \cdot \mathbf{R}_{nm})(\boldsymbol{\mu}_m \cdot \mathbf{R}_{nm})}{R_{nm}^5} \right] \quad (2.13)$$

Die Wellenfunktion des Systems lässt sich als Superposition der gewichteten einzelnen Wellenfunktionen der Moleküle darstellen:

$$|\Psi\rangle = c_1 |1\rangle + c_2 |2\rangle \quad (2.14)$$

$c_{1,2}$ stellen hier Koeffizienten dar, welche die Anteile der ursprünglichen Wellenfunktionen $|1\rangle$ und $|2\rangle$ an der neuen Wellenfunktion $|\Psi\rangle$ beschreiben. Durch die zusätzliche Interaktion J_{12} sind die Energien E_1 und E_2 nicht mehr die Eigenwerte des Systems. Die neuen Eigenzustände und Eigenenergien können durch Diagonalisierung des Hamiltonoperators in Gl.(2.12) bestimmt werden. Durch Lösen des Eigenwertproblems erhält man die Wellenfunktionen und Energieeigenwerte der neuen angeregten Zustände:

$$|k_{\pm}\rangle = c_1 |1\rangle + c_2 |2\rangle = \sqrt{\frac{1 \pm s}{2}} |1\rangle \pm \sqrt{\frac{1 \mp s}{2}} |2\rangle \quad (2.15)$$

$$E_{\pm} = E_m \pm \sqrt{\Delta^2 + J_{12}^2} \quad (2.16)$$

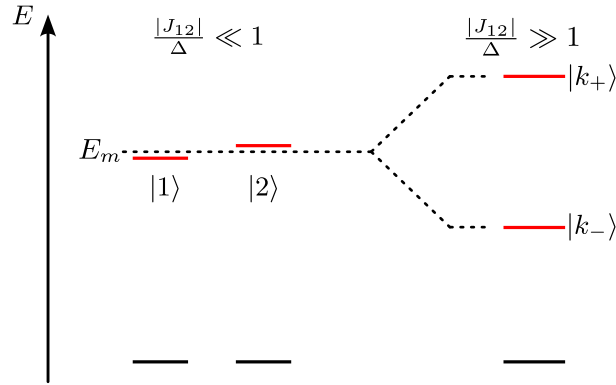


Abbildung 2.3: Zustandsdiagramm zweier wechselwirkender Chromophore. Die Grund- bzw. angeregten Zustände der Moleküle 1 und 2 sind in schwarz bzw. rot dargestellt. Für eine schwache Wechselwirkung zwischen den Chromophoren entsprechen die Zustände und Eigenenergien denen der ursprünglichen Moleküle (links). Wird die Kopplung stärker spalten die Zustände in zwei Exziton-Zustände $|k_{\pm}\rangle$ auf (rechts).

Dabei gilt $s = \frac{\Delta}{\sqrt{\Delta^2 + J_{12}^2}}$, $E_m = \frac{1}{2}(E_1 + E_2)$ und $\Delta = \frac{1}{2}(E_1 - E_2)$. Das Verhältnis der Stärke der Wechselwirkung zur energetischen Unordnung der beteiligten Zustände $\frac{|J_{12}|}{\Delta}$ grenzt zwei Spezialfälle voneinander ab.

Für $\frac{|J_{12}|}{\Delta} \gg 1$ wird von starker Kopplung zwischen den Übergangsdipolmomenten gesprochen. Gl.(2.15) und Gl.(2.16) implizieren eine Aufspaltung der ursprünglichen Energieniveaus der einzelnen Moleküle in zwei angeregte Zustände $|k_{\pm}\rangle$ mit den Energieniveaus $E_{\pm}$. Die Anregung ist delokalisiert, sodass nicht explizit bestimmt werden kann, welches der ursprünglichen einzelnen Moleküle angeregt ist. Für die Übergangsdipolmomente der beiden neuen Zustände gilt dann:

$$\boldsymbol{\mu}_{\pm} = c_1 \boldsymbol{\mu}_1 \pm c_2 \boldsymbol{\mu}_2 \quad (2.17)$$

$\boldsymbol{\mu}_+$ und $\boldsymbol{\mu}_-$ sind senkrecht zueinander orientiert.

Der zweite Grenzfall $\frac{|J_{12}|}{\Delta} \ll 1$ beschreibt eine schwache Kopplung der Moleküle. Angewandt auf die Gl.(2.15) und Gl.(2.16) folgt hierfür:

$$|k_{\pm}\rangle \approx |1, 2\rangle \quad (2.18)$$

$$E_{\pm} \approx E_{1,2} \quad (2.19)$$

Die Zustände und Energien entsprechen den ursprünglichen Werten der nicht untereinander wechselwirkenden Molekülen. In Abbildung 2.3 sind die Energiezustände für schwache (links) und starke (rechts) Kopplung zwischen zwei Chromophoren graphisch

dargestellt.

Beide Grenzfälle spielen in den LH2-Komplexen der Purpurbakterien eine wichtige Rolle. In den folgenden Kapiteln soll daher genauer auf die Kopplung und die daraus resultierenden Dynamiken eingegangen werden. Zudem soll der Bezug zu den Energiedynamiken in LH2-Komplexen hergestellt werden.

2.3 Schwache Kopplung

Für kleine Wechselwirkungsenergien und signifikante Unterschiede zwischen den angeregten Energieniveaus zweier benachbarter Chromophore spricht man von einer schwachen Kopplung der Übergangsdipolmomente. In diesem Regime ist die elektronische Kopplung deutlich kleiner als sowohl die energetische Unordnung der Übergänge als auch die Kopplung der Chromophore an ihre vibrationale Umgebung. Entsprechend bleiben die ursprünglichen, lokalisierten angeregten Zustände der einzelnen Chromophore sowie deren Energieniveaus in erster Näherung unverändert, wie in Gl. (2.18) und (2.19) bereits dargelegt und schematisch in Abbildung 2.3 (links) dargestellt. Die Anregung ist somit auf einem der beteiligten Chromophore lokalisiert und kann durch einen Frenkel-Exziton mit überwiegend lokalem Charakter beschrieben werden [60].

Obwohl die elektronische Kopplung in diesem Fall zu schwach ist, um eine Delokalisierung der Anregung über mehrere Chromophore zu bewirken oder eine nennenswerte energetische Aufspaltung der Zustände hervorzurufen, ist sie dennoch ausreichend, um einen effizienten Energietransfer zwischen den Chromophoren zu ermöglichen. Der Energietransfer erfolgt hierbei als strahlungsfreier, dipol-dipol-vermittelter Prozess und wird durch den *Förster-Resonanz-Energietransfer* (FRET) beschrieben [61, 62]. Dieser Mechanismus basiert auf der Coulomb-Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente und ist charakterisiert durch eine starke Abhängigkeit der Transfargeschwindigkeit vom Abstand der Chromophore sowie vom spektralen Überlapp zwischen Donoremmission und Akzeptorabsorption.

Im Grenzfall schwacher Kopplung und starker System-Bad-Wechselwirkung kann der Energietransfer als ein inkohärenter Prozess beschrieben werden, bei dem die Anregung diskret von einem Chromophor zum nächsten übertragen wird. Dieser Prozess wird häufig auch als „Hopping“ bezeichnet und steht im Gegensatz zur kohärenten Exzitondynamik, wie sie bei stärkerer Kopplung auftritt [63, 64]. Die Förster-Theorie

liefert in diesem Regime eine gute Beschreibung der Energietransferraten und erlaubt es, experimentell beobachtete Transferzeiten quantitativ mit strukturellen Parametern der Chromophoranordnung zu verknüpfen.

Für die BChl *a* Moleküle des B800-Rings in LH2-Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* sind energetische Unordnungen von etwa 125 cm^{-1} sowie eine Kopplungsstärke von lediglich -24 cm^{-1} zwischen benachbarten Molekülen bekannt. Das negative Vorzeichen der Kopplung lässt sich durch die Spitze-zu-Fuß-Anordnung der Übergangsdipolmomente im B800-Ring erklären [21, 65]. Aufgrund der vergleichsweise großen Unordnung gegenüber der Kopplungsstärke ist eine Delokalisierung der Anregung über mehrere B800-Chromophore energetisch nicht begünstigt. Die Energiedynamik des B800-Rings lässt sich daher sehr gut im Rahmen der schwachen Kopplung und eines Förster-artigen Energietransfers beschreiben, was auch durch zeitaufgelöste spektroskopische Studien experimentell bestätigt wurde [66].

Insgesamt stellt der B800-Ring in LH2-Komplexen somit ein anschauliches Beispiel für ein photosynthetisches System dar, in dem Energieübertragung überwiegend inkohärent erfolgt und durch lokale Anregungen sowie stochastische Fluktuationen der Energieniveaus geprägt ist. Dieser Grenzfall der schwachen Kopplung bildet einen wichtigen Referenzpunkt für die Einordnung der Energiedynamik komplexerer, stärker gekoppelter Pigmentsysteme.

2.4 Starke Kopplung

In Kapitel 2.2 und Abbildung 2.3 rechts ist der Grenzfall der starken Wechselwirkung zwischen zwei Chromophoren dargestellt. Dieses Modell soll im folgenden Abschnitt auf N miteinander wechselwirkenden Molekülen ausgeweitet werden.

Für eine Zahl $N > 2$ wechselwirkender Chromophore erweitert sich der Hamiltonoperator $\hat{H}$ für das System:

$$\hat{H} = \sum_{n=1}^N (E_0 + \Delta E_n) |n\rangle \langle n| + \frac{1}{2} \sum_m^N \sum_{n \neq m}^N J_{nm} |n\rangle \langle m| \quad (2.20)$$

Die Zustände $|n\rangle$ und $|m\rangle$ beschreiben das Molekül n bzw. m , auf dem die Anregung lokalisiert ist. Für die zugehörigen Eigenenergien E_0 des ungestörten Systems ist eine

Unordnung δE_n berücksichtigt, welche sich für die verschiedenen Chromophore individuell unterscheidet. Diese nennt man auch *diagonale Unordnung*, da sie sich auf die diagonalen Matrixelemente des Hamiltonoperators bezieht. Die Stärke der Wechselwirkung zwischen den Molekülen n und m wird durch J_{nm} ausgedrückt. Die Eigenzustände $|k\rangle$ des Hamiltonoperators werden auch *Frenkel-Exzitonen* genannt [67, 68]. Sie entsprechen einer Linearkombination der ursprünglichen Zustände $|n\rangle$:

$$|k\rangle(t) = \sum_{n=1}^N c_{nk}(t) |n\rangle, \quad (2.21)$$

wobei $c_{nk}(t)$ zeitabhängige Koeffizienten sind. Für die Anordnung in einem homogenen Ring (lineare Kette, periodische Randbedingungen, $\Delta E_n = 0$ für alle n) erhält man:

$$|k\rangle = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{n=1}^N e^{i2\pi k \frac{n}{N}} |n\rangle, \quad (2.22)$$

mit den zugehörigen Eigenenergien E_k :

$$E_k = E_0 + 2|J_{nm}| \cos\left(\frac{2\pi k}{N}\right) \quad (2.23)$$

Aus Gl.(2.23) geht hervor, dass die Aufspaltung zwischen energieärmsten und energiereichsten Exziton-Zustand $4|J_{nm}|$ entspricht. Aufgrund der Symmetrie des Cosinus-Anteils ist ebenfalls ersichtlich, dass die Zustände paarweise entartet sind, mit Ausnahme des energieärmsten und energiereichsten Zustands [69, 70]. Aus diesem Grund werden die Zustände $k = 1, \dots, N$ umnummeriert in $k = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, +\frac{N}{2}$ für eine gerade Anzahl an Chromophoren, bzw. $k = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm\frac{N-1}{2}$ für ungeradzahlige N . Die Übergangsdipolmomente $\boldsymbol{\mu}_k$ der Zustände $|k\rangle$ lassen sich ebenfalls aus der Summe der Übergangsdipolmomente der einzelnen Moleküle $\boldsymbol{\mu}_k$, gewichtet mit dem zugehörigen Faktor c_{nk} :

$$\boldsymbol{\mu}_k = \sum_{n=1}^N c_{nk} \boldsymbol{\mu}_n \quad (2.24)$$

Für den homogenen Ring ergibt sich daraus, dass die Oszillatorenstärke in den Zuständen $k = \pm 1$ konzentriert ist [71, 72].

Nun soll die diagonale Unordnung mit berücksichtigt werden ($\Delta E_n \neq 0$). Dies führt zu einer Mischung der Exziton-Zustände, wodurch sich die Oszillatorenstärke auch auf den Zustand $k = 0$ verteilt. Ebenfalls ändern sich die Energieniveaus der Exziton-Zustände, wodurch die paarweise Entartung aufgehoben wird [73, 74]. Die Aufspaltung der Ener-

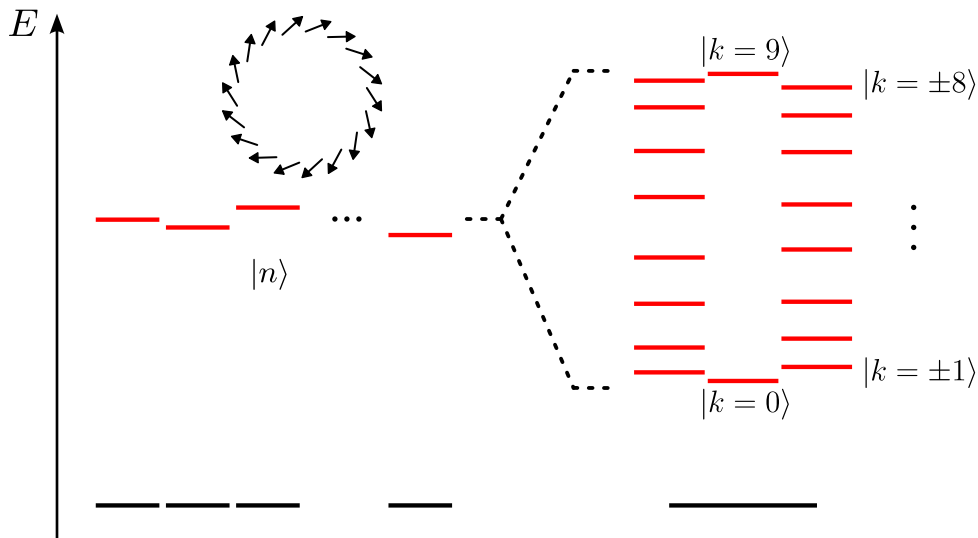


Abbildung 2.4: Zustandsdiagramm für N miteinander wechselwirkenden Chromophoren. Grundzustände sind in schwarz, angeregte Zustände in rot abgebildet. Die Aufspaltung der Energieniveaus $|n\rangle$ ist dargestellt für die Anordnung von $N = 18$ Chromophoren in einem homogenen Ring. Die schwarzen Pfeile skizzieren die Anordnung der Übergangsdipolmomente und geben keine Auskunft über deren Anzahl.

gieniveaus ist für den Spezialfall eines homogenen Rings mit $N = 18$ Chromophoren in Abbildung 2.4 dargestellt. Die neuen Zustände werden typischerweise in einer Leiterdarstellung aufgetragen. Die ohne energetische Unordnung entarteten Zustände sind links und rechts nebeneinander dargestellt, während der energieärmste ($k = 0$) und energiereichste Zustand ($k = 9$) mittig präsentiert sind.

Dieses Model beschreibt die Situation der Energielandschaft des B850-Rings sehr gut [69–72, 74, 75]. In dem eng gepackten Ring eines LH2-Komplexes der Spezies *Rps. acidophila* liegen 18 BChl *a* Moleküle vor. Für die Wechselwirkung zwischen zwei benachbarten BChl *a* sind dabei Werte von $J_{nm} \approx 300 \text{ cm}^{-1}$ ermittelt worden.

2.5 Spektroskopische Eigenschaften von LH2 Komplexen

Die theoretischen Überlegungen aus den vorherigen Kapiteln sollen im Folgenden am Beispiel von LH2 Komplexen zusammengetragen und die Absorptionseigenschaften verdeutlicht werden. In Abbildung 2.5 sind dafür die Absorptionsspektren von BChl *a* (A), sowie von einem kompletten LH2 Komplex der Spezies *Rps. acidophila* (B) dargestellt.

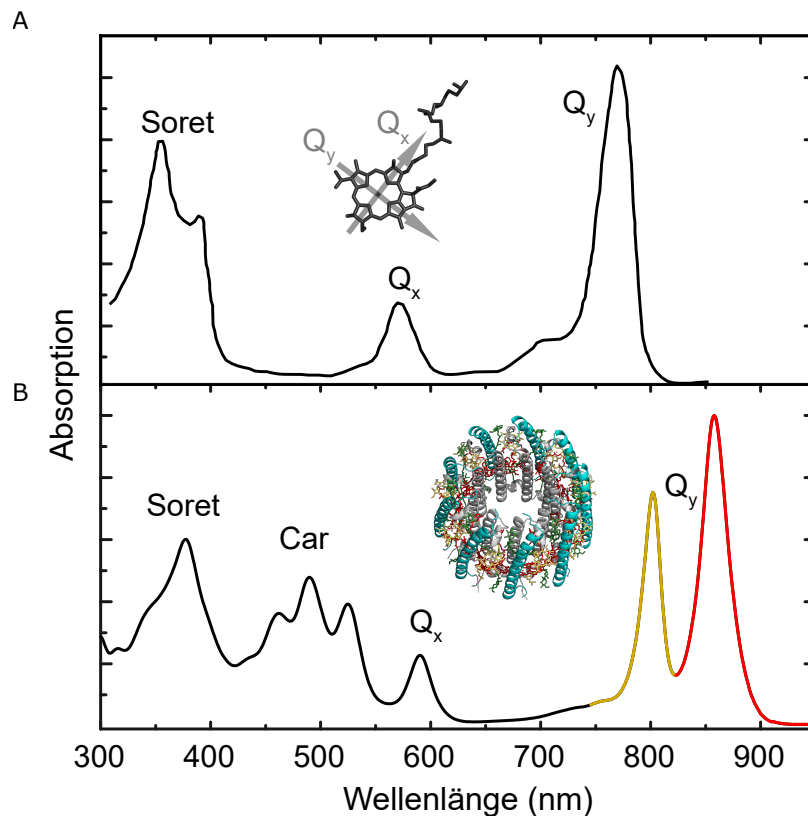


Abbildung 2.5: Absorptionsverhalten von BChl *a* Molekülen im Vergleich zu LH2 Komplexen. A) Absorptionsspektrum eines Ensembles von BChl *a* Molekülen, Daten entnommen aus [4]. B) Absorptionsspektrum eines Ensembles von LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila*, Daten entnommen aus [19]. Details siehe Text.

Betrachtet man zunächst einzelne BChl *a* Moleküle, so weisen diese eine Q_x -Bande bei etwa 570 nm und eine Q_y -Bande bei ca. 760 nm auf (vgl. Abbildung 2.5A). Diese entsprechen dem Übergang vom Grundzustand in den ersten angeregten Singulettzustand. Zudem lässt sich im Bereich von 200 nm bis 300 nm eine Absorptionsbande erkennen. Diese weist auf einen hochenergetischen Übergang hin und stellt den in Abschnitt 2.1 elektronischen Übergang in höhere Zustände dar. Sie wird als *Soret*-Bande bezeichnet.

27 solcher BChl *a* Moleküle sind in einem Proteingerüst in zwei konzentrischen Ringen à 9 bzw. 18 Molekülen angeordnet. Im 9-Moleküle-Ring herrscht nur eine schwache Wechselwirkung zwischen den Chromophoren, daher können Chromophore als separiert betrachtet werden und wechselwirken nur mit dem eingestrahlten Licht (Zustandsübergang) und mit dem umgebenden Proteingerüst, was zu einer Rotverschiebung der Absorptionsbanden führt. Der zweite Ring, welcher 18 BChl *a* Moleküle enthält,

weist eine starke Kopplung zwischen den Q_y -Übergangsdipolmomenten auf. Aufgrund der ringförmigen Anordnung der Chromophore, sowie der *Head-to-Tail*-Orientierung der Übergangsdipolmomente bildet sich eine energetische Exzitonband-Struktur aus (vgl. Kapitel 2.4). Dabei besitzen im Wesentlichen nur die niedrigsten Exzitonzustände ($k = 0, \pm 1$) Oszillatorenstärke mit dem Grundzustand, wodurch es zu einer Rotverschiebung der Absorption im Vergleich zum isolierten BChl *a* Molekül kommt (~ 860 nm). Diese Wechselwirkung variiert für LH2 Komplexe anderer Spezies, welche keine neun-, jedoch z.B. eine acht-zählige Ringstruktur aufweisen [41]. Durch die unterschiedlichen Stärken der Wechselwirkung zwischen den BChl *a* Molekülen in den beiden Ringen, entstehen aus der ursprünglichen Q_y -Bande der BChl *a* Moleküle zwei Absorptionsbanden im LH2 Komplex. Die B800-Bande bei 800 nm beschreibt die (aufgrund der Wechselwirkung der Chromophore mit dem umgebenden Proteingerüst) leicht rotverschobene Absorption der Moleküle des 9-Molekül-Rings, während die Bande bei 860 nm (B850-Bande) der Absorption der stark miteinander wechselwirkenden BChl *a* Moleküle im 18-Molekül-Ring entspricht.

Auch im Absorptionsspektrum der LH2-Komplexe lässt sich hochenergetische Bande zwischen 350 nm und 400 nm ausmachen. Diese beschreibt hier ebenfalls die Übergänge vom Grundzustand des System in höhere angeregte Singulettzustände und wird als Soret-Bande bezeichnet.

Abschließend sollen noch die ebenfalls im Proteingerüst enthaltenen Karotenoide erwähnt sein, welche zu einer Absorptionsbande im sichtbaren Spektrum bei etwa 500 nm führen.

Kapitel 3

Material und Methoden

Dieses Kapitel enthält eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation und des Versuchsaufbaus, der zur Untersuchung der Proben verwendet wurde. Dazu werden die experimentellen Methoden erläutert. Zunächst soll die Präparation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten LH2-Proben in Abschnitt 3.1 dargelegt werden. Der experimentelle Aufbau wird in Abschnitt 3.2 gezeigt. Zum besseren Verständnis der Experimente wird in den Abschnitten 3.3 und 3.4 die experimentelle Methode zur Kompensation ultrakurzer Pulse und die Erzeugung kohärenter Pulspaare zur Durchführung von fluoreszenzdetektierter kohärenter Spektroskopie beschrieben. Abschließend wird die Datenaufnahme und Analyse der aufgenommenen Daten in Kapitel 3.5 dargelegt.

3.1 Probenpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden B800-B850 LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila*, sowie LH2-Komplexe der Spezies *Rps. palustris*, welche unter schwachen Lichtbedingungen gewachsen sind, untersucht. Die LH2 Proben wurden von unseren Kooperationspartnern Richard J. Cogdell (Universität Glasgow) und Alastair T. Gardiner (Universität Glasgow und Centre Algatech Trebon) isoliert [12, 76]. Kurz zusammengefasst werden die Membranzellen der Purpurbakterien mithilfe einer French-Presse aufgebrochen, nicht gewünschte Fragmente werden zunächst durch langsame, dann durch schnelle Zentrifugation entfernt. Das Produkt wird anschließend in einem Detergenzpuffer (Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 % LDAO) gelöst, nicht-lösliche Stoffe werden erneut durch Zentrifugieren entfernt. Das gelöste Material wird auf einem Sucrose Dichte Gradient gebettet und zentrifugiert (190 000g, 14 h). Aufgrund der unterschiedlichen Massen werden LH2-Komplexe und RC-LH1-Komplexe voneinander getrennt und iso-

liert [4, 76].

Alle bereitgestellten Proben werden bis zur Verwendung in einer Detergenzpufferlösung (Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 % LDAO) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Untersuchung einzelner Komplexe wurden die Stammlösungen in mehreren Schritten auf eine Konzentration von $\sim 10\text{ pM}$ weiter verdünnt. Im letzten Schritt der Verdünnung enthält die Pufferlösung 2 % (w/w) Polyvinylalkohol (PVA). Ein Tropfen von $\sim 20\text{ }\mu\text{L}$ wird auf einem zuvor mit Aceton gereinigtem Deckglas gespincoated, wodurch ein dünner Polymerfilm mit eingebetteten isolierten LH2-Komplexen entsteht [19, 41]. Die Probe wird dann sofort in einer selbst entwickelten Raumtemperatur-Vakuumkammer montiert und mit Argongas geflutet, um ein Ausbleichen durch Reaktion mit Sauerstoff zu vermeiden [51, 59].

3.2 Experimenteller Aufbau

In diesem Abschnitt wird der Aufbau zur Durchführung ultraschneller Spektroskopie an einzelnen LH2-Komplexen beschrieben. Abbildung 3.1 zeigt das Konzept des selbst-gebauten Fluoreszenzmikroskops.

Zur Erzeugung der Anregungspulse wird ein Ti:Sa-Lasersystem (Titan-Ionen-dotiertes Saphirkristall-System, Modell *Griffith W-10*, *KMLabs*) verwendet, das durch Modenkopplung Laserpulse von etwa 30 fs Dauer und einer Wiederholrate von 80 MHz erzeugen kann. Die Wellenlänge der Ausgangspulse kann durch Prismen in einem Bereich von 700 nm bis 920 nm durchgestimmt werden, die Ausgangsleistung beträgt bis zu 600 mW. Der Anregungsstrahl durchläuft einen dielektrischen Langpassfilter (*AHF*, Grenzwellenlänge: 610 nm), sowie einen variablen Kurzpassfilter (*AHF*, eingestellte Grenzwellenlänge: ca. 875 nm). Zur Einstellung der Anregungsleistung werden zwei Filterräder (*Thorlabs*) verwendet, mit welchen sich die optische Dichte (OD) kontinuierlich in einem Bereich von 0,0 bis 4,0 pro Rad einstellen lässt.

Die Laserpulse können mit einem Pulsformer *MIIPS-HD* (*BiophotonicSolutions Inc.*) mit einer gefalteten 4f-Anordnung weiter komprimiert und manipuliert werden. Die spektralen Komponenten der eingehenden Pulse mit einer Bandbreite $\Delta\nu$ werden dabei durch ein goldbeschichtetes Gitter gebeugt und durch eine Linse in der Maskenebene fokussiert, in der ein räumlicher Lichtmodulator (*engl.: spatial light modulator*, SLM), der aus einem Flüssigkristalldisplay (*engl.: liquid crystal display*, LCD, 800×600 Pixel, LCOS-SLM X11840-07(X), *Hamamatsu*) besteht, platziert ist. Mit Hilfe der kommer-

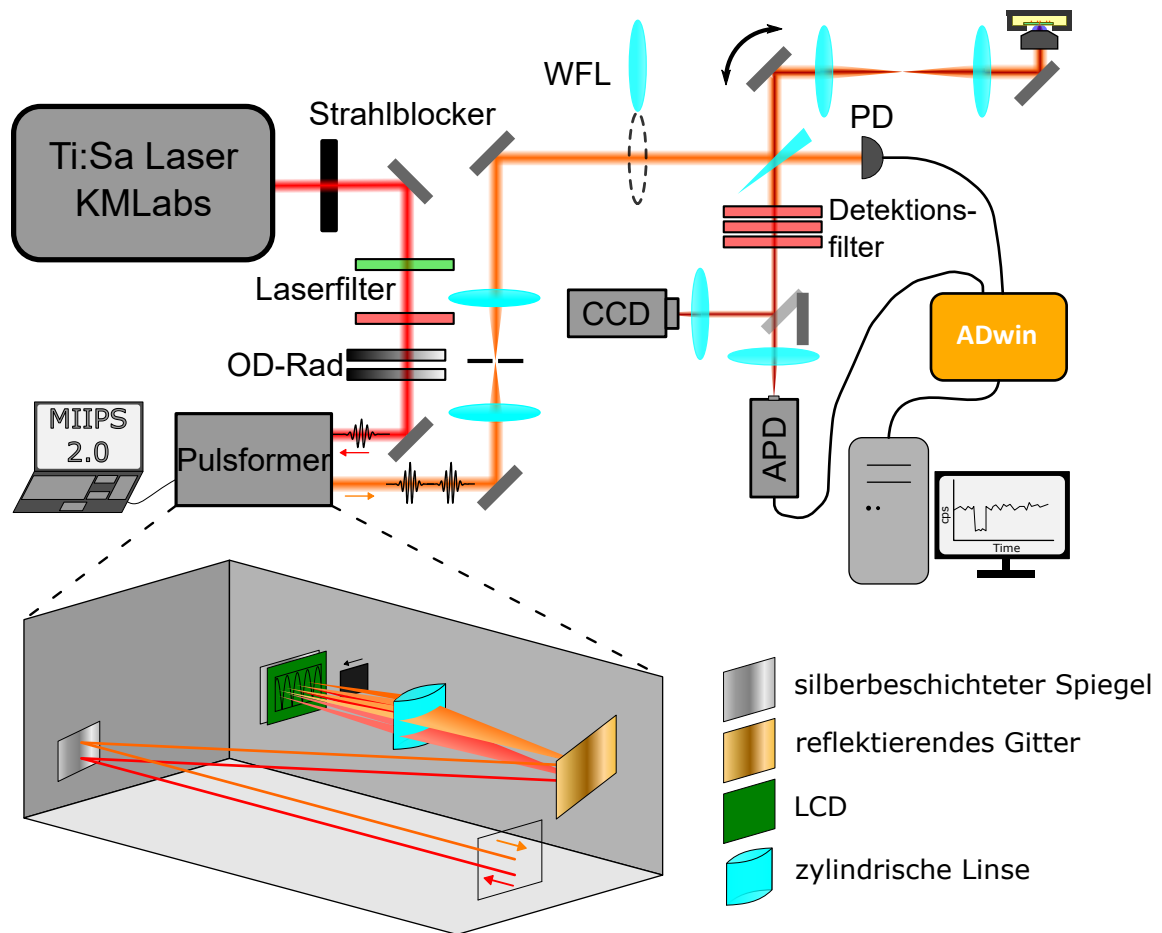


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau. Die vom Ti:Sa-Lasersystem (rot) erzeugten Laserpulse durchlaufen dielektrische Reinigungsfilter sowie zwei reflektierende OD-Räder zur Regulierung der Anregungsleistung und werden im Pulsformer (orange) komprimiert und manipuliert. Mit Hilfe eines Raumfilters (ein Teleskop aus zwei Linsen mit einer Lochblende in der Brennebene) wird nach dem Pulsformer nur die erste Ordnung ausgewählt. Die Anregung wird über einen Glaskeil, der als Strahlteiler fungiert, auf die Probe gerichtet. Mit Hilfe eines Scan-Spiegels und eines Systems telezentrischer Linsen kann der Anregungs- und Detektionspunkt auf der Probe räumlich verschoben werden. Ein Wasserimmersionsobjektiv fokussiert die Anregung auf die Probenebene. Die Fluoreszenz wird mit demselben Objektiv aufgefangen. Eine Reihe von Emissionsfiltern blockiert das verbleibende Streulicht aus der Anregung des durch den Glaskeil übertragenen Lichts. Das Fluoreszenzlicht kann entweder mit einer CCD-Kamera oder einem Einzelphotonen-Zählmodul erfasst werden. Abbildung nach [77]. Details siehe Text.

ziellen Software *MIIPS 2.0* können Masken für das LCD implementiert werden, welche die Polarisierung und den Brechungsindex der einzelnen Pixel variieren und so die Amplitude bzw. die Phase der einzelnen spektralen Komponenten beeinflussen. Die Laserpulse werden von einem Spiegel hinter dem LCD reflektiert, so dass der Anregungsstrahl das LCD ein zweites Mal passiert und am Reflexionsgitter rekombiniert wird. Um die ein- und ausgehenden Pulse zu trennen, wird der Spiegel hinter dem LCD leicht gekippt, so dass die Strahlen räumlich getrennt werden. In einigen Experimenten dieser Arbeit wird ein Pulsspektrum benötigt, welches nur mit der B850-Absorptionsbande der LH2-Komplexe überlappt. Dies kann durch veränderte Einstellung der Prismen im Ti:Sa-Lasersystem oder einen weiteren dielektrischen Langpassfilter mit passender Grenzwellenlänge erreicht werden. In dieser Arbeit ist der Aufbau des Pulsshapers um einen räumlich verschiebbaren Strahlblocker erweitert worden, der hinter dem Beugungsgitter platziert ist. Dadurch werden einfallende spektrale Komponenten blockiert. Für Experimente, bei denen nur die B850-Bande angeregt werden soll, wird der variable Strahlblocker so platziert, dass spektrale Komponenten unterhalb einer Wellenlänge von 820 nm geblockt werden.

Um nur mit der ersten Beugungsordnung des Shapers zu arbeiten, wird der Anregungsstrahl durch einen Raumfilter geleitet, der aus zwei Linsen (Brennweite $f = 100$ mm) und einer Lochblende (Durchmesser = 80 μ m) besteht. Die erste Linse fokussiert den Strahl in die Apertur der Lochblende, während die zweite Linse den Strahl wieder parallelisiert. Licht, das aus der ersten Beugungsordnung stammt, wird durch die Lochblende selektiert.

Das Anregungslicht trifft auf einen Glaskeil, der als Strahlenteiler fungiert. Etwa 4 % des Lichts wird zur Anregung der Proben geleitet, und das transmittierte Licht wird von einer Photodiode (*ELUB*) erfasst. Dieses Signal dient als Referenz für die Anregungsleistung, der die Proben während der Messung ausgesetzt sind. Das Anregungslicht wird über einen motorisierten Scan-Spiegel (*OWIS*-Schrittmotoren) und ein telezentrisches Linsensystem (Brennweiten $f = 150$ mm) auf einen Mikroskoptisch in ein Objektiv ($NA = 1,2$, Wasserimmersion, *Olympus*) geleitet. Die Proben sind in einer speziell angefertigten Vakuumzelle platziert. Die Anregungspulse werden durch das Objektiv in die Probenebene fokussiert.

Die resultierende Fluoreszenz wird durch das selbe Objektiv aufgesammelt. Das durch den Glaskeil transmittierte Licht durchläuft eine Reihe von dielektrischen Detektionsfiltern, die das reflektierte und gestreute Laserlicht blockieren und für die Wellenlänge der

Fluoreszenz transparent sind. Die Fluoreszenz kann nun entweder über einen Klappspiegel mit einer CCD-Kamera (Andor iKon) oder alternativ einer APD (Single Photon Counting Module (SPCM), Perkin Elmer, Detektorfläche $50 \times 50 \mu\text{m}$, dark counts < 100 counts per second, output TTL 250 ps) detektiert werden.

Das Signal der APD wird von einem Echtzeit-Mikrocontroller (ADwin-Gold II, *Jäger GmbH*) verarbeitet und zur weiteren Analyse der Daten an einen Computer gesendet. Die Zeitaufösung der APD kann somit durch die Programmierung des ADwin bestimmt werden und ist für die Experimente in dieser Arbeit auf 20 ms eingestellt. Das hierfür benötigte ADbasic-Programm wurde selbst geschrieben.

3.3 Pulskompensation

Die vom Ti:Sa-Lasersystem erzeugten Pulse durchlaufen im Strahlengang zur Probe mehrere dispergierende optische Elemente, wie Linsen oder dielektrische Filter. Für Experimente auf dem Gebiet der zeitaufgelösten ultraschnellen Spektroskopie ist es wichtig, die Dispersion der Anregungspulse am Ort der Probe gering zu halten. Mit dem Pulsformer und der Multiphotonen-Intrapuls-Interferenz-Phasenscan-Methode (MIIPS), beschrieben von Vadim V. Lozovoy et.al. und Bingwei Xu et.al. beschriebenen Multiphotonen-Intrapuls-Interferenz-Phasen-Scan (MIIPS) werden die Pulse so komprimiert, dass die Probe mit transformationsbegrenzten (*engl.: transformation-limited*, TL) Pulsen angeregt wird [78, 79].

Die spektrale Phase eines TL-Pulses entspricht einer linearen Funktion und ist frei von Krümmungen. In MIIPS werden bekannte spektrale Phasenfunktionen $f(\omega, \delta)$ vom Pulsformer implementiert (δ entspricht dabei einem Abtastparameter), um die Krümmungen der unbekannten spektralen Phase $\varphi(\omega)$ des erzeugten Pulses am Probenort zu kompensieren:

$$f(\omega, \delta) = A \cdot \cos(\gamma(\omega - \omega_m) + \delta) \quad (3.1)$$

Die Amplitude wird auf $A = 2$ gesetzt [80]. Der Wert des festen Parameters γ soll der zeitlichen Breite des Pulses entsprechen und beträgt in den Experimenten dieser Arbeit 20 fs für die Kompensation von Pulsen zur Anregung beider LH2-Absorptionsbanden bzw. 42 fs für Pulse zur alleinigen Anregung der B850-Bande. ω_m steht für die Modulationsfrequenz und entspricht der mittleren Frequenz des Pulsspektrums. Der Parameter δ wird in einem Bereich von 0 bis 2π gescannt und das SHG-Spektrum wird gemessen. Daraus ergibt sich eine 2D-Darstellung des SHG-Signals in Abhängigkeit

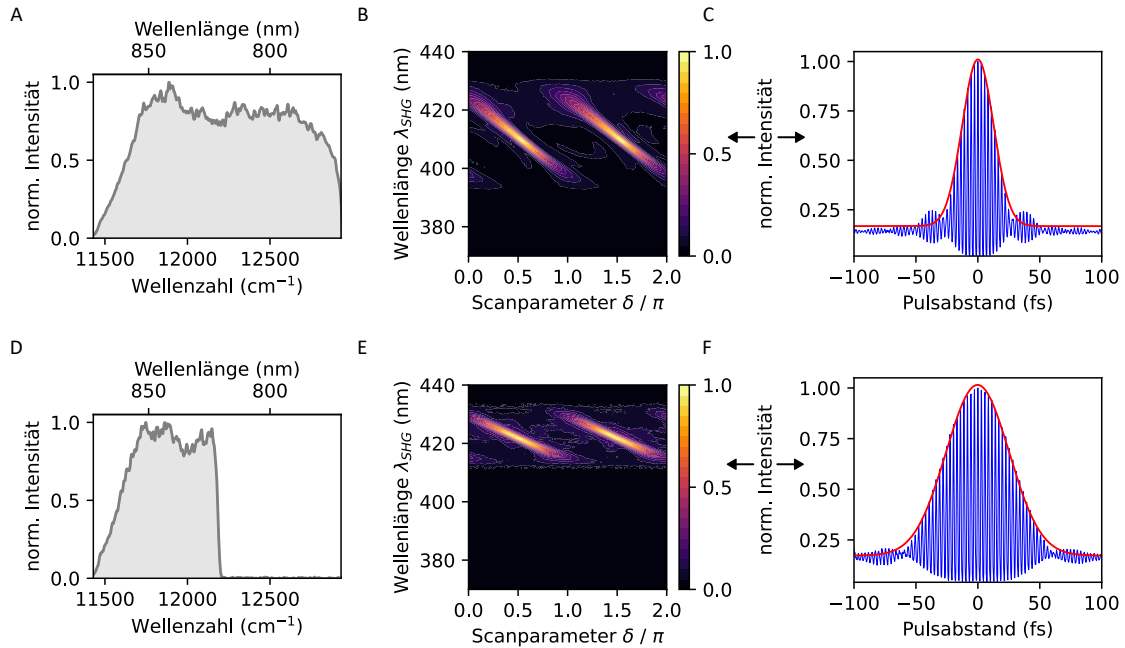


Abbildung 3.2: Multiphotonen-Intrapuls-Interferenz-Phasenscan und SHG Autokorrelation zweier Pulsspektren. A), D) Laserspektren (grau), B), E) MIIPS Intensität in Abhängigkeit der des Scan-Parameters δ und der Wellenlänge λ_{SHG} und C), F) SHG-Autokorrelation (blau) und einhüllende Gauß-Funktion (rot) der komprimierten Pulse zur Anregung A)-C) beider Absorptionsbanden B800 und B850 bzw. D)-F) nur der B850 Absorptionsbande.

von der Frequenz ω und dem Abtastparameter δ . Abbildung 3.2 B) und E) zeigen die 2D-Darstellung eines MIIPS eines komprimierten Pulses zur Anregung beider Absorptionsbanden bzw. nur der B850-Bande. Die Intensitätsmaxima des Plots verraten, bei welchem Parameterwert $\delta_{max}(\omega)$ die Krümmung der spektralen Phase des Pulses optimiert wurde. Daraus lässt sich eine Kompensationsfunktion $f(\omega, \delta_{max}(\omega))$ bestimmen, die wiederum an den SLM übergeben wird, um die Krümmungen der spektralen Phase des Pulses zu kompensieren. Dies geschieht in sechs Iterationsschritten, nach dem letzten Schritt sind die Abweichungen annähernd Null, und die Kompensationsmaske ist gleich der Summe der Kompensationsfunktionen aller Schritte.

Mit Hilfe des SLM können zusätzliche Autokorrelationsscans durchgeführt werden. Dazu werden die Pulse durch den Pulsshaper in zwei identische Pulse mit einem zeitlichen Abstand τ aufgespalten, der Pulsabstand wird in einem Bereich von -100 fs bis 100 fs in $0,25$ fs-Schritten variiert. Die Pulsbreite kann aus der Hüllkurve der Autokorrelation bestimmt werden. In Abbildung 3.2 C) und F) sind die Autokorrelation der Pulse in blau dargestellt, die Hüllkurve, eine an die Maxima der Autokorrelation gefittete Gauß-Funktion, ist in rot eingezeichnet. Um die Breite des komprimierten Pulses zu

bestimmen, muss die FWHM der einhüllenden Gauß-Kurve durch $\sqrt{2}$ geteilt werden. So ergibt sich für die Pulse aus Abbildung 3.2 eine Pulsdauer von C) 20,7 fs und F) 41,3 fs.

Bei allen Messungen in dieser Arbeit wird die auf diese Weise bestimmte Kompensationsmaske hinzugefügt, um transformations-limitierte (TL) Anregungspulse am Ort der Probe sicherzustellen.

3.4 Erzeugung phasenstarrer Pulspaare

Im Folgenden werden der Hintergrund, sowie die experimentelle Implementierung der Doppelpulsanregung im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Experimente dieser Art werden in vorherigen Forschungsarbeiten auch als fluoreszenz-detektierte kohärente Spektroskopie bezeichnet [81].

Dabei werden zur Doppelpulserzeugung meist Michelson- oder Mach-Zehnder-Interferometer verwendet [81–83]. Ein eingehender Laserpuls wird durch einen optischen Strahlteiler auf zwei Lichtwege aufgeteilt, anschließend werden beide Wege wieder zu einem Lichtweg rekombiniert. Die Differenz der Weglänge der unterschiedlichen Pfade bestimmt, aufgrund der gleichen Geschwindigkeit der Pulse, den zeitlichen Abstand zwischen den beiden Pulsen auf dem rekombinierten Lichtweg. Mithilfe von motorisierten Verschiebetischen und Spiegeln, können die Lichtwege und damit der Abstand zwischen den Pulsen verändert und variiert werden werden. Diese Methode stellt eine Manipulation der Eingangspulse in der Zeitdomäne dar.

Eine weitere Möglichkeit Erzeugung von Doppelpulsen ist die Manipulation der Pulse in der Frequenzdomäne unter Verwendung eines SLM. Die Funktionsweise eines SLM ist bereits in Kapitel 3.2 beschrieben. Bei dieser Herangehensweise werden spektrale Amplituden- ($A(\omega)$) und spektrale Phasenmasken ($\phi(\omega)$) durch das LCD implementiert [80]:

$$A(\omega) = C(\tau) \cdot \left| \cos \left(\frac{1}{2} [(\omega - \Omega_L) \tau + \Delta\varphi] \right) \right| \quad (3.2)$$

$$\phi(\omega) = \frac{\pi}{2} \cdot \text{sgn} \left[\cos \left(\frac{1}{2} [(\omega - \Omega_L) \tau + \Delta\varphi] \right) \right] \quad (3.3)$$

Das Pulsspektrum wird durch die Amplitudenmask $A(\omega)$ moduliert, dabei entspricht ω den Frequenzen des Pulsspektrums horizontal verteilt über die Pixel des SLM. Der Parameter Ω_L beschreibt die Modulationsmitte und wird als *Lock-Frequenz* bezeichnet.

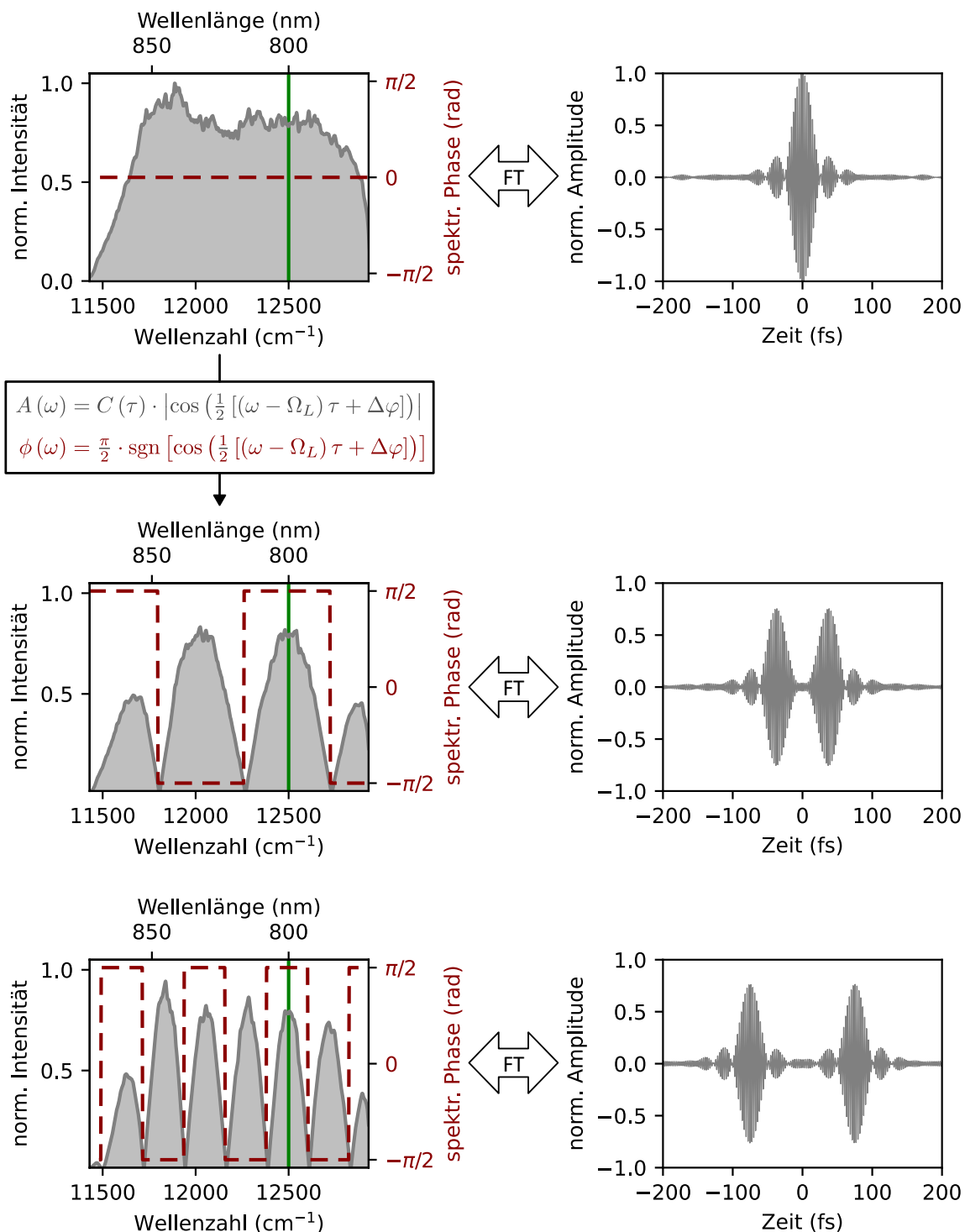


Abbildung 3.3: Pulsformung im Frequenzraum. Oben links: Ausgangsform des Pulses (Spektrum in grau, spektrale Phase in gestrichelt rot). Multiplikation des Spektrums mit einer Amplitudenmaske $A(\omega)$ und Addition einer Phasenmaske $\phi(\omega)$ für $\tau = 72$ fs (mitte links) und $\tau = 150$ fs (unten links) erzeugen die zeitlichen Pulspaare (rechts). Die vertikalen grünen Linien stellen die Lock-Frequenz Ω_L dar.

net, für alle Pulsabstände τ ist bei dieser Frequenz die spektrale Phase konstant auf einen Wert gesetzt. Mit dem Parameter $\Delta\varphi$ wird die Phasenrelation zwischen den beiden erzeugten Pulsen beschrieben. Aufgrund der Amplitudenmodulation ist die Anregungsintensität nicht konstant für alle zeitlichen Pulsabstände. Aus diesem Grund wird der Parameter $C(\tau) \in [0, 1]$ eingeführt und für jedes Pulspaar mit zeitlichem Abstand τ so gewählt, dass die Anregungsleistung konstant für alle τ ist.

Da die Frequenzdomäne über die Fouriertransformation mit der Zeitdomäne verknüpft ist, wird durch Manipulation der spektralen Informationen des Pulses auch die zeitliche Form des Pulses beeinflusst (*pulse shaping*)[84–86]. Abbildung 3.3 stellt dies graphisch dar. In der oberen Reihe ist das Spektrum und die spektrale Phase (rot) eines transformations-limitierten Anregungspulses abgebildet. Die flache Phase deutet an, dass bereits eine Kompensationsmaske angewendet wurde. Zur Erzeugung eines Doppelpulses wird das Spektrum mit einer Amplitudenmaske Gl.(3.2) multipliziert und eine Phasenmaske Gl.(3.3) zur spektralen Phase des Pulses addiert. Durch Fouriertransformation erhält man die neue zeitliche Information des Pulspaares (Abb. 3.3 rechts). In diesem Beispiel sind Pulspaare mit einem zeitlichen Abstand von $\tau = 72$ fs (Abb. 3.3 Mitte) und $\tau = 150$ fs (Abb. 3.3 unten) dargestellt. Die Lock-Frequenz Ω_L (vertikale grüne Linie) ist in beiden Beispielen auf 800 nm festgelegt.

3.5 Messmethode und Datenanalyse

In diesem Abschnitt werden die Signalverarbeitung, sowie die Datenanalyse dargelegt.

Wie schon im Abschnitt 3.2 beschrieben, wird der Puls-Shaper über eine kommerzielle Software angesteuert, während das Signal der Detektoren mit Hilfe des ADwin-Controllers und einer selbst geschriebenen Software aufgenommen und gespeichert wird. Zur Erzeugung der phasen-gelockten Pulspaare werden die entsprechenden Masken $A(\omega)$ und $\phi(\omega)$ für alle Anregungspulsabstände τ der Messung vorab nach Gl.(3.2) und Gl.(3.3) berechnet und an die Shaper-Software übermittelt. Dazu wurde ein selbst geschriebenes Python-Programm verwendet. Mit Hilfe der kommerziellen Software werden die verschiedenen Masken nacheinander implementiert. Die Dauer, für die eine Amplituden- und Phasenmaskenkombination im LCD implementiert ist, wurde für alle Messungen auf $T_{mask} = 1$ s festgesetzt. Durch die aufeinanderfolgende Implementierung der Masken wird Schritt für Schritt der zeitliche Abstand der Anregungspulse variiert. Der Pulsabstand τ wird in den in dieser Arbeit präsentierten Experimenten von 0 fs

bis 252 fs in 6 fs Schritten variiert.

Die Abfolge der Masken, wie eben beschrieben, wird bei Experimenten an isolierten LH2-Komplexen mehrmals für denselben Komplex bzw. im Falle von Messungen an einem Ensemble aus Komplexen an der selben Stelle der Probe wiederholt. Dadurch werden stets mehrere Sequenzen des gleichen Experiments gemessen. In Abbildung 3.4A kann ein Ausschnitt einer solche Messung eingesehen werden. Das Beispiel zeigt eine Messung an einem Ensemble von LH2-Komplexen der Spezies *Rps. acidophila*. Das Messsignal ist in grau dargestellt. Um zwischen einer bestimmten Messsequenz i und der darauffolgenden Sequenz besser unterscheiden zu können, wird in den Ablauf der Masken eine zusätzliche Maske implementiert, welche die Anregung der Probe unterdrückt ($A(\omega) = 0$, für alle Wellenlängen). Dies lässt sich deutlich an dem abfallenden Signal bei etwa 110 s, 214 s und 318 s erkennen.

Abbildung 3.4B gibt einen genaueren Einblick in einen 10 s-Ausschnitt des Messsignals von 115 s bis 125 s. Die Messdauern, in denen eine Maske mit einem bestimmten Pulsabstand implementiert ist, sind durch gepunktete Linien abgegrenzt. Über den jeweiligen Blöcken ist der Pulsabstand aufgetragen. Um Messartefakte ausschließen zu können, wird zu dem in schwarz dargestellten eigentlichen Experiment (Messung der Fluoreszenz in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands der Anregungspulse) ein Referenzexperiment (grün) durchgeführt. Nach jeder Maske die zu einer Anregung der Probe mit einem Doppelpuls führt, wird dazu eine Maske implementiert, welche die Anregung durch einen transform-limitierten Puls ($\tau = 0$) erzeugt. Dies ist auch im Beispiel in Abbildung 3.4B zu sehen. Nach einem Block in dem die Probe durch Pulspaare mit zeitlichem Abstand $\tau = 12$ fs angeregt wird (schwarz), folgt ein Block mit Anregungen durch transform-begrenzte Pulse (grün). Anschließend ist die Maske für die nächsten Pulspaare mit $\tau = 18$ fs implementiert, worauf wieder eine TL-Maske folgt.

Zur Analyse der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von dem zeitlichen Abstand der anregenden Pulspaare, wird das Messsignal in den Blöcken, wie in Abbildung 3.4B beschrieben ausgewertet. Da es bei einem Wechsel zwischen zwei implementierten Masken eine gewisse Zeit braucht, bis die Flüssigkristalle des LCD im Pulsformer vollständig ausgerichtet sind, muss dies bei der Analyse der Daten mit berücksichtigt werden. Die Dauer einer vollständigen Phase-Umschaltung typischer LC-SLMs liegt bei etwas weniger als 250 ms [87]. Bei moderneren Liquid-Crystal-on-Silicon (LCOS) Displays, wie sie von *Hamamatsu* angeboten und in dem hier verwendeten Pulsformer *MIIPS-HD*

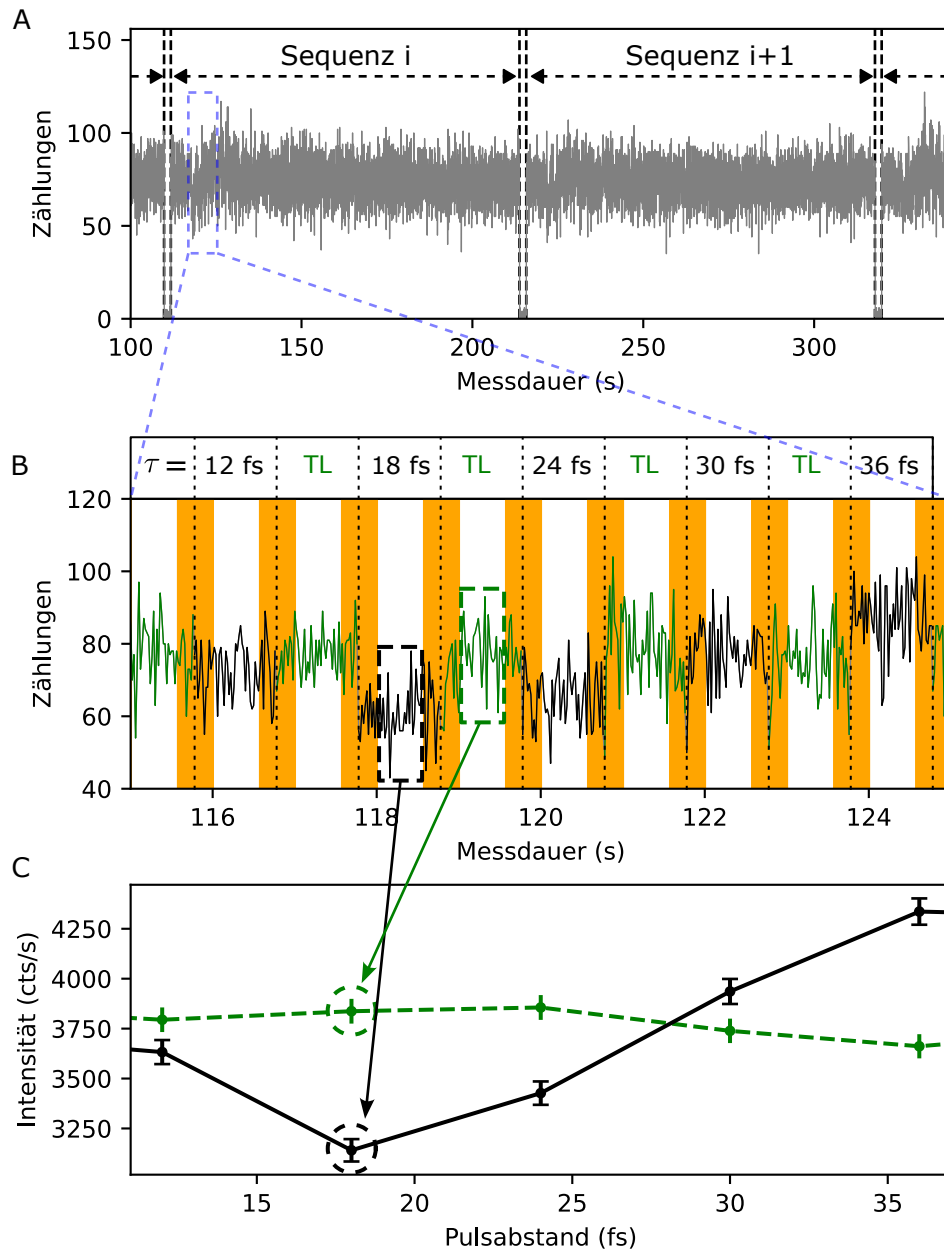


Abbildung 3.4: Prinzip der Datenanalyse. A) Auszug eines Datensatzes (grau) einer Messung an einem Ensemble von LH2-Komplexen der Spezies *Rps. acidophila*. B) Abwechselnde Implementierung der Masken für Doppelpulsanregung (schwarz) und TL-Pulsen zur Referenzmessung (grün). Datenpunkte im orange markierten Bereich werden für die Auswertung der Daten nicht berücksichtigt. Die Zeitauflösung in A und B beträgt 20 ms. C) Auswertung der in B gezeigten Messdaten. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten der Zählungen während Dauer einer implementierten Amplituden- und Phasenmaske, ohne Berücksichtigung der Zählungen, während des Umschaltvorgangs der Flüssigkristalle des Pulsformers.

verbaut ist, sind die ermittelten Umschaltdauern noch niedriger [88, 89]. Daher ist in den Experimenten dieser Arbeit für das Ausrichten der Flüssigkristalle eine Dauer von 250 ms für die Datenanalyse angenommen worden, Datenpunkte in diesem Zeitraum sind für die Bestimmung der mittleren Fluoreszenz nicht berücksichtigt. Zusätzlich werden die Photonenzählungen der letzten 100 ms einer implementierten Maske nicht zur Berechnung der mittleren Fluoreszenz verwendet, um sicher zu gehen, dass der Umschaltzeitpunkt nicht in die Datenauswertung eingeht. In Abbildung 3.4B sind diese nicht berücksichtigten Datenbereiche durch orangene Blöcke gekennzeichnet. Für die Bestimmung der mittleren Fluoreszenz nach Anregung der Probe durch Pulspaare mit definiertem zeitlichem Abstand τ werden nur die Daten aus den weißen Bereichen verwendet. In Abbildung 3.4C sind die Mittelwerte der Intensität in den Maskenblöcken für den in B dargestellten Messzeitraum dargestellt. Die schwarzen Datenpunkte in C stellen dabei die Mittelwerte der entsprechenden Intensitäten dar, bei denen ein Pulspaar mit zeitlichem Abstand τ implementiert ist. In grün ist die Auswertung der Zählungen bei implementierten TL-Referenzmasken aufgetragen. Für die Daten bei $\tau = 18$ fs ist explizit dargestellt, dass zunächst die Zählungen während der implementierten τ -Masken ausgewertet werden und das zu diesem Pulsabstand gehörende Referenzsignal direkt danach gemessen wird.

Kapitel 4

Ultraschnelle Spektroskopie an Lichtsammelkomplexen der Spezies *Rps. acidophila*

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen an LH2-Komplexen der Purpurbakterienspezies *Rps. acidophila* vorgestellt. Die Experimente beinhalten die Anregung der Ensemble- und Einzelkomplex-Proben mit phasenstarken Pulspaaren. In Abschnitt 4.1 werden die Ergebnisse bei Anregung beider Absorptionsbanden beschrieben, während in Kapitel 4.2 nur die B850 Band untersucht wird. In beiden Abschnitten wird zunächst auf die experimentellen Voraussetzungen der Experimente eingegangen und Unterschiede erklärt.

Die Messungen und Ergebnisse in diesem Kapitel sind in der Publikation „*Fluorescence-detected Wavepacket Interferometry reveals time-varying Exciton Relaxation Pathways in single Light-Harvesting Complexes*“ veröffentlicht worden [90].

4.1 Anregung der B800 und B850 Bande

4.1.1 Experimentelles

Die untersuchten LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* sind wie in Kapitel 3.1 beschrieben präpariert und in einer Vakuumzelle eingesetzt worden, um den Kontakt der Proben mit Sauerstoff zu vermeiden. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mithilfe des motorisierten Scanspiegels werden Anregungs- und Detektionspunkt auf der Probe hin zu einzelne Komplexe verfahren. Die Position wurde für

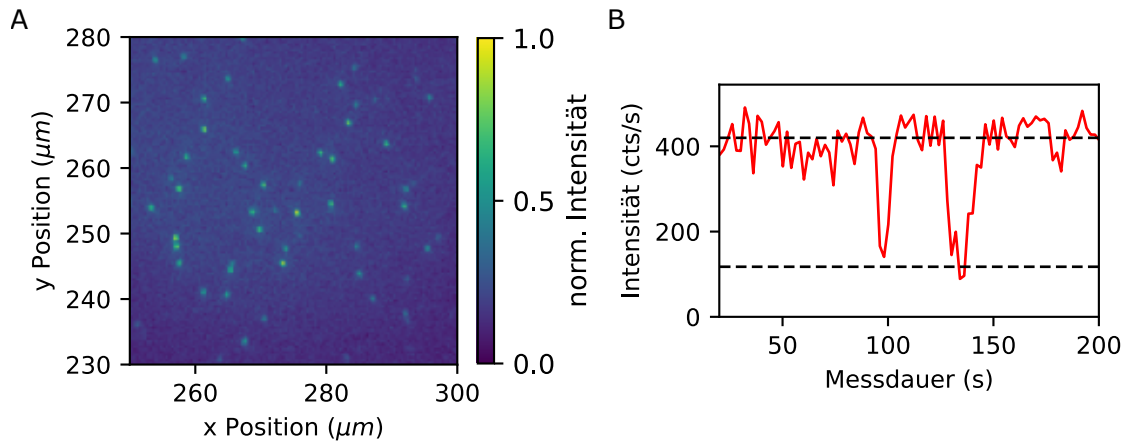


Abbildung 4.1: Weitfeld Bild und zeitliches Fluoreszenzsignal einzelner Komplexe von *Rps. acidophila*. A) CCD-Aufnahme der Fluoreszenz einer Einzelkomplex-Probe bei Weitfeld-Anregung. Die Belichtungsdauer beträgt 5 s. B) Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzsignals eines individuellen Komplexes. Die An-Aus-Sprünge der Fluoreszenz zeigen den Blinking-Effekt einzelner Objekte.

jeden Komplex vor der eigentlichen Messung so optimiert, dass das Emissionssignal gemessen mit der APD maximale Werte erreichte. Diese Position wurde während den Experimenten an einem Komplex nicht verändert. Das Laserspektrum ist durch die Prismen des Ti:Sa Lasersystems so eingestellt worden, dass es mit beiden Absorptionsbanden der LH2-Komplexe überlappt. Dieser Überlapp zwischen Anregung und Absorption ist bei den jeweiligen Ergebnissen mit abgebildet. Die Erzeugung der phasenstarrten Pulspaare aus dem Ausgangsspektrum des Ti:Sa Lasersystems erfolgt wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Die Mitte der Modulation ist für alle in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse auf entspricht einer Wellenlänge von 800 nm bzw. $12\,500\text{ cm}^{-1}$. Die zeitlich gemittelte Intensität der Anregung wird für alle Pulspaarkombinationen auf $200\frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ gesetzt. Mit einer Wiederholrate von 80 MHz des Lasersystems entspricht dies einer Fluenz von $1,0 \times 10^{13}$ Photonen pro Puls pro cm^2 , oder einer Anregung pro zehn Pulse, unter Berücksichtigung eines Absorptionsquerschnitts der B800 Bande von $\sigma_{B800} = 1,0 \times 10^{-14}\text{ cm}^2$ [91, 92]. Dies rechtfertigt die Annahme eines linearen Anregungsregimes, dadurch können Annihilationseffekte ausgeschlossen werden. Die aufgesammelte Fluoreszenz wird durch drei dielektrische Filter (Langpass 885 nm) von zurückgestreutem Anregungslicht getrennt.

Zur Überprüfung der Qualität einer Einzelkomplex-Probe wird vor den Messungen ein Weitfeldbild der Probe aufgenommen. Dazu wird die zusätzliche Linse WFL (siehe Abbildung 3.1) in den Anregungsstrahlengang des optischen Aufbaus mit eingebaut.

Die Anregung in der Probenebene ist dadurch defokussiert und die Probe wird großflächig beleuchtet. Zur Detektion der Fluoreszenz wird die CCD-Kamera verwendet. In Abbildung 4.1A ist das CCD-Bild einer solchen Weitfeld-Messung dargestellt. Details zur Bestimmung der μm -Skala findet sich in Anhang A.2. Das Bild zeigt räumlich voneinander separierte Punkte, welche der Fluoreszenz individueller LH2-Komplexe entsprechen.

Abbildung 4.1B zeigt den Ausschnitt des zeitlich aufgelösten Fluoreszenzsignals eines einzelnen LH2-Komplexes. Die Anregungsbedingungen sind über die Messung konstant gehalten. Bei der Zeitmarke 100 s und noch einmal bei 140 s ist ein kurzer, jedoch starker Abfall auf den Hintergrundwert von etwa 100 Zählungen pro Sekunde des Signals zu sehen. Dies ist ein, für einzelne Objekte typisches, Blinking-Verhalten, wobei der Komplex von einem An-Zustand (hohe Fluoreszenz) in einen Aus-Zustand (niedrige Fluoreszenz) wechselt und wieder zurück.

4.1.2 Ergebnisse

In Abbildung 4.2A ist der Überlapp des Anregungsspektrum (grau) mit dem Ensemble Absorptionsspektrum der LH2 Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* (gelb für die B800 Bande bzw. rot für die B850 Bande) dargestellt. Die B800 Bande wird dabei voll überdeckt, sowie ein großer Anteil der B850 Bande, die mmit der abfallenden Flanke des Anregungsspektrums zusammenfällt. Der grüne Pfeil markiert die Lock-Frequenz Ω_L der erzeugten phasenstarrten Pulspaare. Abbildung 4.2B zeigt die Fluoreszenzantwort eines Ensembles von LH2-Komplexen. In rot ist das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands der anregenden Pulse dargestellt, wobei die Phasendifferenz zwischen den Pulsen $\Delta\varphi = 0$ für alle zeitlichen Abstände τ beträgt. Es ist eine Modulation festzustellen, welche nach etwa 150 fs abklingt. Die relative Amplitude der Modulation beträgt 42 %. Als Vergleich ist das Experiment ebenfalls mit einer Phasendifferenz von $\Delta\varphi = \pi$ durchgeführt worden (blau), die Fluoreszenzantwort zeigt einen invertierten Verlauf in Abhängigkeit von τ im Vergleich zu dem ursprünglichen Experiment. Dies deutet darauf hin, dass die Modulationen ihren Ursprung in Interferenzen haben.

Ein Beispiel für die Messung an einem individuellen Komplex ist in Abbildung 4.2C aufgezeigt. Die Graphik zeigt sechs Panels, wobei die ersten fünf Panels Fluoreszenzantworten einzelner τ -Scans darstellen. Die schwarzen Datenkurven präsentieren die Fluoreszenz für Anregungspulse mit einer Phasendifferenz $\Delta\varphi = 0$, die blauen Kurven $\Delta\varphi = \pi$. Das unterste Panel stellt das Mittel der fünf einzelnen Scans in rot ($\Delta\varphi = 0$)

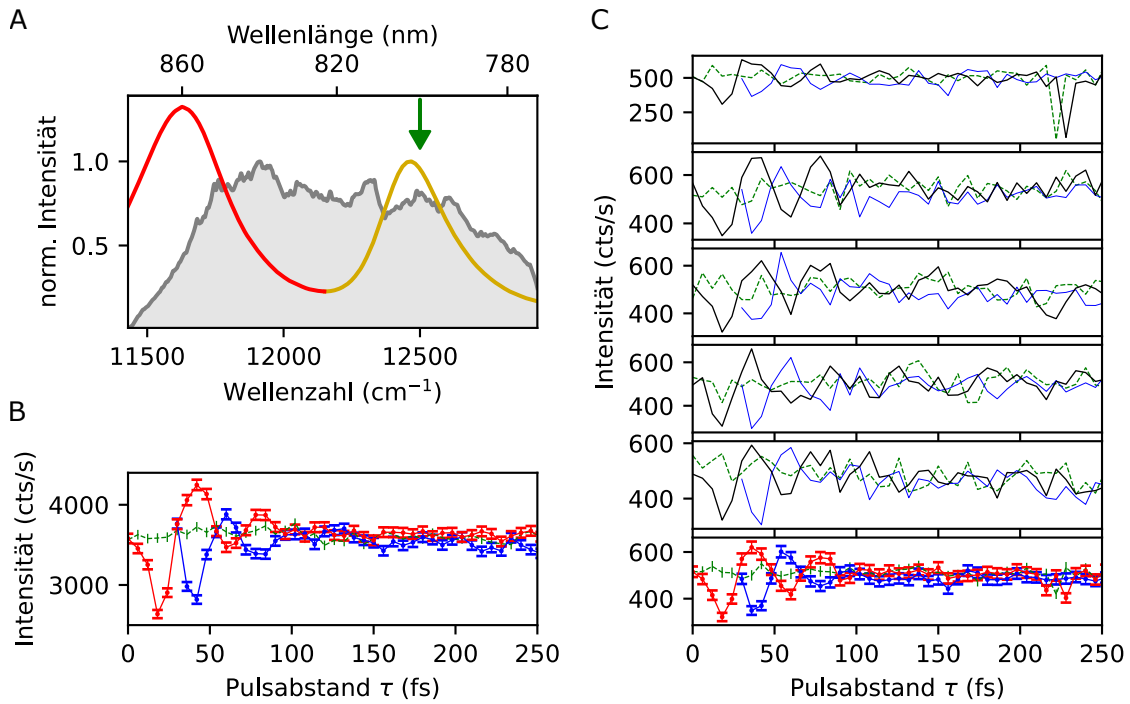


Abbildung 4.2: Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung beider Absorptionsbanden eines Ensembles und individuellen LH2-Komplexes der Spezies *Rps. acidophila*. A) Spektrales Profil der Anregungspulse (graue Fläche), zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum des Ensembles mit aufgetragen (gelb bzw. rot für B800 bzw. B850 Bande). Der grüne Pfeil markiert die Lock-Frequenz Ω_L des Experiments. B) Fluoreszenzantwort eines LH2-Ensembles in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands der Anregungspulse. C) Fluoreszenzantwort eines individuellen LH2-Komplexes in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands der Anregungspulse. Die schwarzen Kurven zeigen einzelne Scans, bei der die Pulse eine Phasendifferenz von $\Delta\varphi = 0$ aufweisen, blaue Daten zeigen Scans mit $\Delta\varphi = \pi$. Die roten und blauen Daten im untersten Plot entsprechen den gemittelten Daten der schwarzen und blauen Einzelscans. Grüne Kurven spiegeln das Referenzexperiment wider.

und blau ($\Delta\varphi = \pi$) dar. Sowohl die Einzelscans, als auch die Mittelung weisen deutliche Modulationen auf, welche nach ca. 50 - 100 fs abklingen. Im ersten Scan ist zudem bei etwa $\tau = 230$ fs ein starker Signalabfall zu erkennen, dieser weist auf einen Blinkingeffekt des Komplexes hin und zeigt erneut, dass individuelle Komplexe gemessen worden sind.

Zur Analyse der Fluoreszenzmodulationen einzelner LH2-Komplexe ist eine Fourieranalyse der Fluoreszenz in Abhängigkeit von τ für insgesamt 29 individuelle Komplexe durchgeführt worden. Daraus erhält man die Oszillationsfrequenzen f der Modulationen.

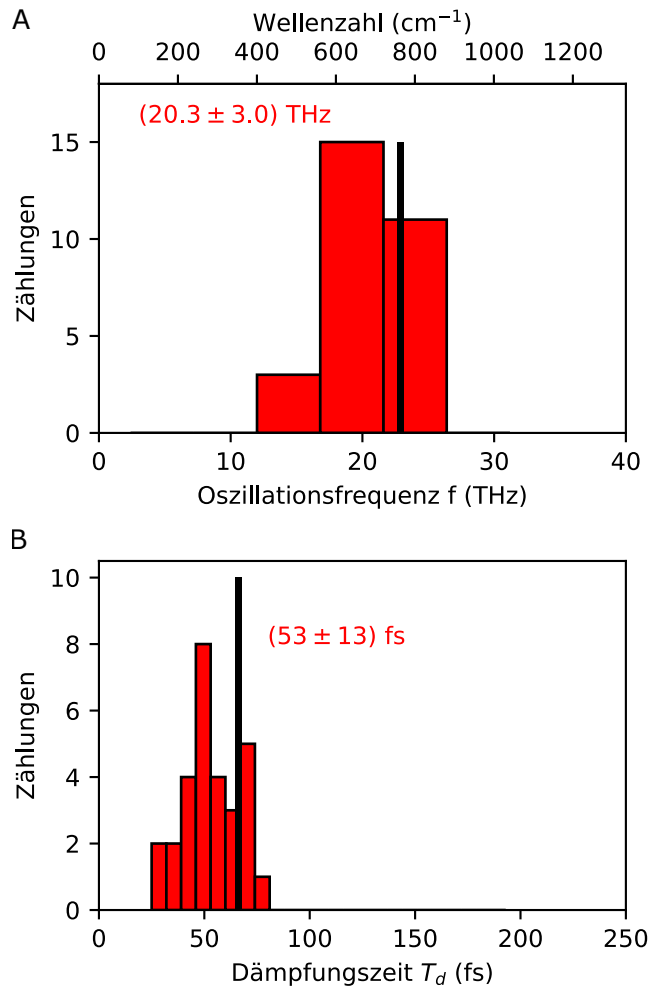


Abbildung 4.3: Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* bei Anregung beider Absorptionsbanden. A) Verteilung der Oszillationsfrequenz f . B) Verteilung der Dämpfungszeit T_d . In beiden Diagrammen sind die statistischen Parameter (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) mit angegeben. Die schwarzen Balken repräsentieren die ermittelten Werte eines Ensembles und liegen bei A) 22,9 THz und B) 66 fs.

nen. In Abbildung 4.3A ist die Statistik über diese Frequenzen dargestellt. Die Modulationsfrequenzen decken einen Bereich von 14 THz - 25 THz um einen Mittelwert von 20,3 THz ab. Dies entspricht in Wellenzahlen einem Bereich von 470 cm^{-1} - 860 cm^{-1} und einem Mittelwert von 675 cm^{-1} . Es sei angemerkt, dass die Auflösung der Fourieranalyse 4 THz beträgt, welche sich aus dem maximal gewählten zeitlichen Pulsabstand von 250 fs bestimmt. Zusätzlich zu den Modulationfrequenzen sollen Zeitkonstanten T_d für die Dämpfung der beobachteten Oszillationen ermittelt werden. Dazu wird an die gemessenen Fluoreszenzmodulationen ein einfaches Modell einer einzelnen, mono-

exponentiell gedämpften Cosinus-Schwingung gefittet:

$$I(\tau) = C_1 \cdot \cos(2\pi f \cdot \tau + \varphi) \cdot e^{-\frac{\tau}{T_d}} + C_2 \quad (4.1)$$

C_1 und C_2 stellen Fitkonstanten dar, mit denen die Amplitude und der Hintergrund des Ergebnisses beschrieben werden. Der Parameter φ entspricht einer Phasenverschiebung. Für f werden die aus den Fourieranalysen erhaltenen Frequenzen der einzelnen Komplexe eingesetzt und festgehalten. Die aus dieser Analyse resultierenden Dämpfungszeiten verteilen sich, wie in Abbildung 4.3B dargestellt, um einen Mittelwert von (53 ± 13) fs.

4.2 Anregung der B850 Bande

4.2.1 Experimentelles

Die Präparation der untersuchten Proben, sowie der Einbau in den optischen Setup und die Bestimmung der optimalen Position zur Aufnahme der Fluoreszenzsignale bleibe unverändert im Vergleich zum Experiment im vorherigen Abschnitt. Auch die im Folgenden dargestellten Experimente sind bei Raumtemperatur durchgeführt worden. Mit Hilfe des Lasersystems wird erneut ein Pulsspektrum erzeugt, das mit beiden Absorptionsbanden der LH2-Komplexe überlappt. Um ausschließlich die Anregung der B850 Bande zu gewährleisten, werden höher energetische spektrale Anteile des Laserspektrums im Pulsformer mit Hilfe eines optischen Strahlblockers unterdrückt worden. Die Anregungsspektren sind mit bei den jeweiligen Ergebnissen abgebildet. Die Doppelpulse zur Anregung der LH2-Komplexe werden erneut mit der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode erzeugt. Dabei werden in diesem Abschnitt zwei unterschiedliche Experimente mit variierter Lock-Frequenz durchgeführt ($\Omega_L = 800$ nm und $\Omega_L = 840$ nm). Die Trennung der aufgesammelten Fluoreszenz von gestreutem Laserlicht erfolgt auch hier durch drei dielektrische Langpassfilter (885 nm).

4.2.2 Ergebnisse

Die Messergebnisse für Doppelpulsanregung der B850 Bande für die beiden unterschiedlichen Lock-Frequenzen sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst. Dabei sind in einer Reihe Experimente unter den gleichen Anregungsbedingungen dargestellt, die in Abb. 4.4A und B zu sehen sind. In beiden Fällen ist das Anregungsspektrum (grau) so angepasst, dass die Anregung nur mit der B850 Bande (gelb und rot für die B800

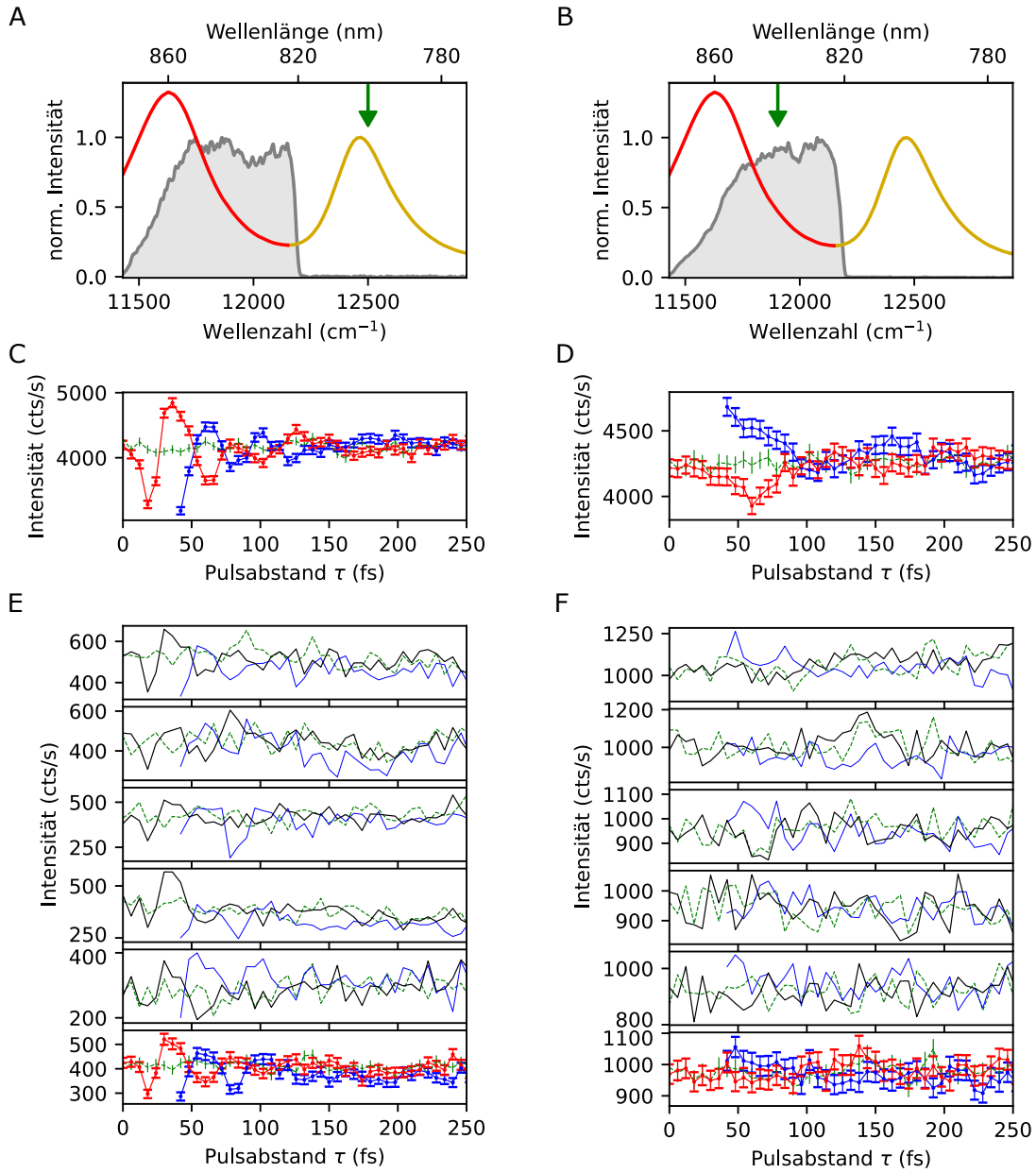


Abbildung 4.4: Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung der B850 Bande eines Ensembles und individuellen LH2-Komplexes der Spezies *Rps. acidophila*. A)-B) Spektrale Profile der Anregungspulse (graue Fläche) mit dem Absorptionsspektrum eines LH2-Ensembles (gelb bzw. rot für B800 bzw. B850 Bande). Die Lock-Frequenzen Ω_L sind mit einem grünen Pfeil markiert. Diese Anregungsbedingungen gelten für die komplette Reihe (z.B. A), C), E)). C)-D) Fluoreszenzantwort eines LH2-Ensembles und E)-F) eines individuellen LH2-Komplexes in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands der Anregungspulse. Die schwarzen und blauen Kurven zeigen einzelne Scans, bei der die Pulse eine Phasendifferenz von $\Delta\varphi = 0$ bzw. $\Delta\varphi = \pi$ aufweisen. Die roten/blauen Daten im untersten Plot entsprechen den gemittelten Daten der schwarzen/blauen Einzelscans. Grüne Kurven spiegeln das Referenzexperiment wider.

bzw. B850 Bande) überlappt. Die Anpassung durch den Strahlblocker im Pulsformer ist an dem steilen Abfall der Spektren bei etwa 820 nm zu erkennen. Die unterschiedlichen Lock-Frequenzen sind durch grüne Pfeile gekennzeichnet.

In Abbildung 4.4C und D sind die Fluoreszenzantworten eines makroskopischen Ensembles für die beiden Anregungsbedingungen aufgezeichnet. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Modulationsfrequenz und -tiefe. Die Messungen mit einer Lock-Frequenz bei 800 nm zeigt sowohl eine im Vergleich schnellere Modulation der Fluoreszenz in Abhängigkeit von τ , als auch eine größere relative Modulationstiefe, die bei 58 % (Abb. 4.4C) und 17 % (Abb. 4.4D) liegen. Die Abbildungen 4.4E und F zeigen jeweils ein Beispiel für eine Messung an einem individuellen LH2-Komplex unter den entsprechenden Anregungsbedingungen. Sowohl für die einzelnen Scans (schwarze und blaue Kurven für die Phasendifferenz $\Delta\varphi = 0$ bzw. $\Delta\varphi = \pi$ zwischen den Anregungspulsen in Abb. 4.4E) als auch für die Mittelung der Einzelscans (rote und blaue Kurve im untersten Panel) sind die Fluoreszenzmodulationen in Abhängigkeit von τ klar zu erkennen. Durch die kleinere Amplitude sind die Modulationen für die Lock-Frequenz bei 840 nm in den einzelnen Scans weniger deutlich ausgeprägt, im Mittel über alle Scans jedoch erkennbar (Abb. 4.4F).

Für beide Anregungsbedingungen ist die Statistik zu den Oszillationsfrequenzen f und Dämpfungszeiten T_d individueller LH2-Komplexe in Abbildung 4.5 einzusehen. Zur Bestimmung der Frequenzen ist eine Fourieranalyse der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit von τ durchgeführt worden. Die Dämpfungszeiten werden durch Fit der Gl.(4.1) an die Daten bestimmt, wobei die Oszillationsfrequenzen f aus der Fourieranalyse als fester Parameter für die jeweiligen Komplexe eingesetzt worden ist. Für Messungen mit einer Lock-Frequenz bei 800 nm sind 16 individuelle Komplexe auf diese Weise analysiert worden. Die Oszillationsfrequenz f weist dabei einen Mittelwert von 21,4 THz (entspricht 710 cm^{-1}), die Verteilung der Frequenzen streckt sich über einen Bereich von 10 THz - 27 THz (330 cm^{-1} - 900 cm^{-1}), siehe Abb. 4.5A. Aufgrund der kleinen Modulationsamplituden der Fluoreszenzantwort für eine Lock-Frequenz bei 840 nm konnten im Rahmen dieser Arbeit nur die Ergebnisse von vier einzelnen Komplexen sinnvoll ausgewertet werden. Zusätzlich sind die Messergebnisse (unter denselben Bedingungen) von Paul Recknagel dargestellt, sodass eine Statistik über 25 individuelle Komplexe ausgewertet werden konnte. Die Oszillationsfrequenzen häufen sich um einen Wert von 8 THz (Abb. 4.5B) und sind kleiner, als die für Anregungen mit einer Lock-Frequenz bei 800 nm, sowohl für ein Anregungsspektrum, welches beide Absorp-

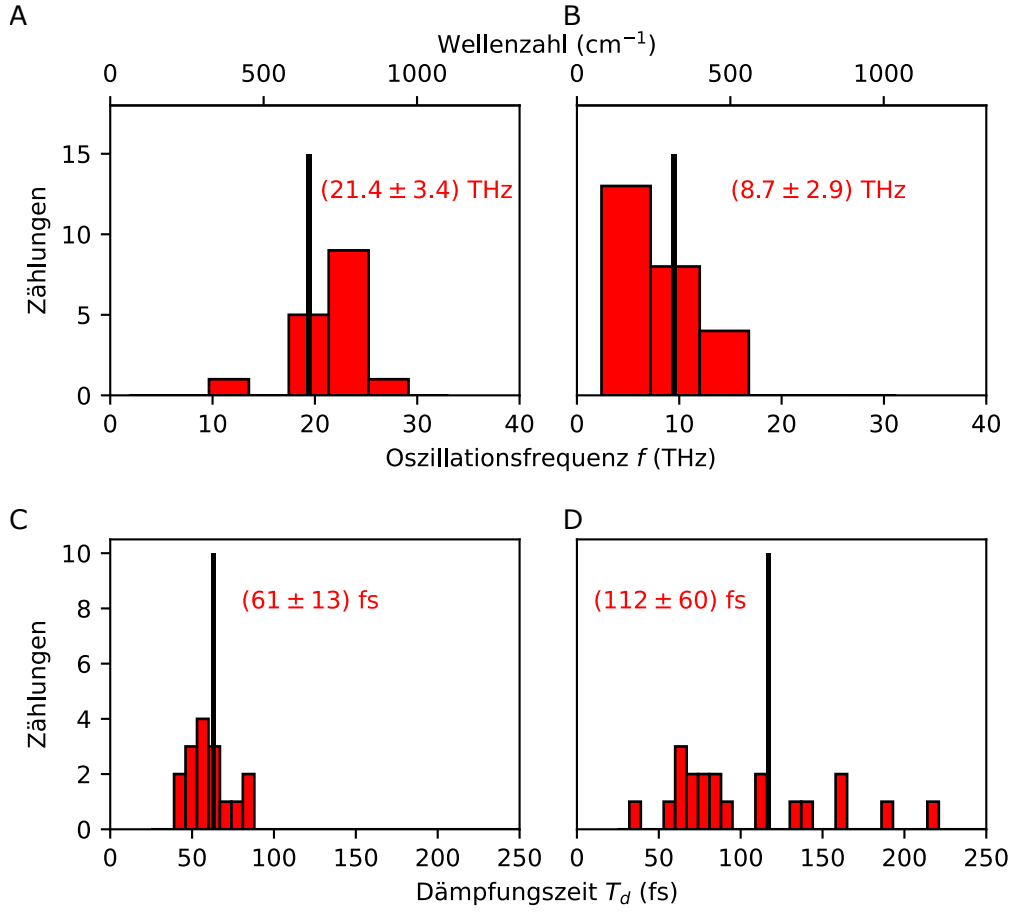


Abbildung 4.5: Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* bei Anregung der B850-Bande. A) Verteilung der Oszillationsfrequenz f . B) Verteilung der Dämpfungszeit T_d . In allen Diagrammen sind die statistischen Parameter (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) mit angegeben. Die schwarzen Balken repräsentieren die ermittelten Werte eines Ensembles und liegen bei A) 19,4 THz, B) 9,5 THz, C) 63 fs und D) 117 fs

tionsbanden abdeckt (Abb. 4.3A), als auch für eines, mit dem nur die B850 Bande angeregt wird (Abb. 4.5A). Die ermittelten Dämpfungszeiten sind im Vergleich zu den in Abb. 4.3B und Abb. 4.5C dargestellten deutlich größer und verteilen sich über einen großen Bereich von 90 fs - 215 fs.

4.2.3 Anregung der B850 Bande bei $\Omega_L = 860$ nm

Zusätzlich zu den bisher gezeigten Ergebnissen sind Referenzmessungen an einigen individuellen LH2 Komplexen durchgeführt worden, bei denen die Lock-Frequenz der Anregungspulse $\Omega_L = 860$ nm in dem spektralen Bereich der niedrigsten Exzitonzustände liegt (siehe grüner Pfeil in Abbildung 4.6A). Die weiteren experimentellen Bedingun-

gen sind mit den vorangegangenen Messungen identisch und können im Abschnitt 4.1.1 eingesehen werden. Des Weiteren sind alle Experimente bei Raumtemperatur und mit einer festen Phasenbeziehung der Pulspaare von $\Delta\varphi = 0$ durchgeführt worden.

Abbildung 4.6B zeigt die Fluoreszenzantwort eines Ensembles von LH2 Komplexen. Das Fluoreszenzsignal (rot) steigt im Vergleich zum Signal des Referenzexperiments (grün) zunächst mit größer werdendem zeitlichen Abstand τ der Anregungspulse, bis zu einem Maximum bei $\tau = 36$ fs. Anschließend fällt das Emissionssignal wieder ab. Eine leichte Modulation ist bis $\tau \approx 120$ fs zu erkennen. Die relative Amplitude der Fluoreszenzerhöhung (bestimmt an der Stelle des Maximums) beträgt ca. 28 %.

Die sechs Graphen in Abbildung 4.6D zeigen die einzelnen Messsequenzen der Beobachtung eines individuellen Komplexes (schwarz), sowie die Mittelung dieser Werte im untersten Diagramm (rot). In allen Einzelsequenzen, sowie beim Mittelwert ist ein ähnlicher Verlauf des Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von τ erkennen, wobei die Modulation schon bei $\tau = 100$ fs abgeklungen ist, und das Emissionssignal dem Referenzsignal gleicht.

Für die 22 vermessenen Einzelkomplexe ist eine Statistik über die aus einer Fourieranalyse erhaltenen Modulationsfrequenzen f ermittelt worden. Diese ist in einem Histogramm in Abbildung 4.6C dargestellt. Die Verteilung der Oszillationsfrequenzen f erstreckt sich über einen Bereich von 0,0 THz bis 14,3 THz (dies entspricht 0 cm^{-1} - 477 cm^{-1}) um einen Mittelwert von 4,3 THz (143 cm^{-1}). Die Auswertung der Messung einer Ensembleprobe (siehe Abbildung 4.6C schwarze Linie) liefert eine Modulationsfrequenz von 4,8 THz, was 160 cm^{-1} entspricht. Im Vergleich mit den vorherigen Ergebnissen der alleinigen Anregung der B850-Bande zeigt sich der Trend, dass die Modulationsfrequenzen mit der Verschiebung der Lock-Frequenz Ω_L von 800 nm hin zu 860 nm immer kleiner wird.

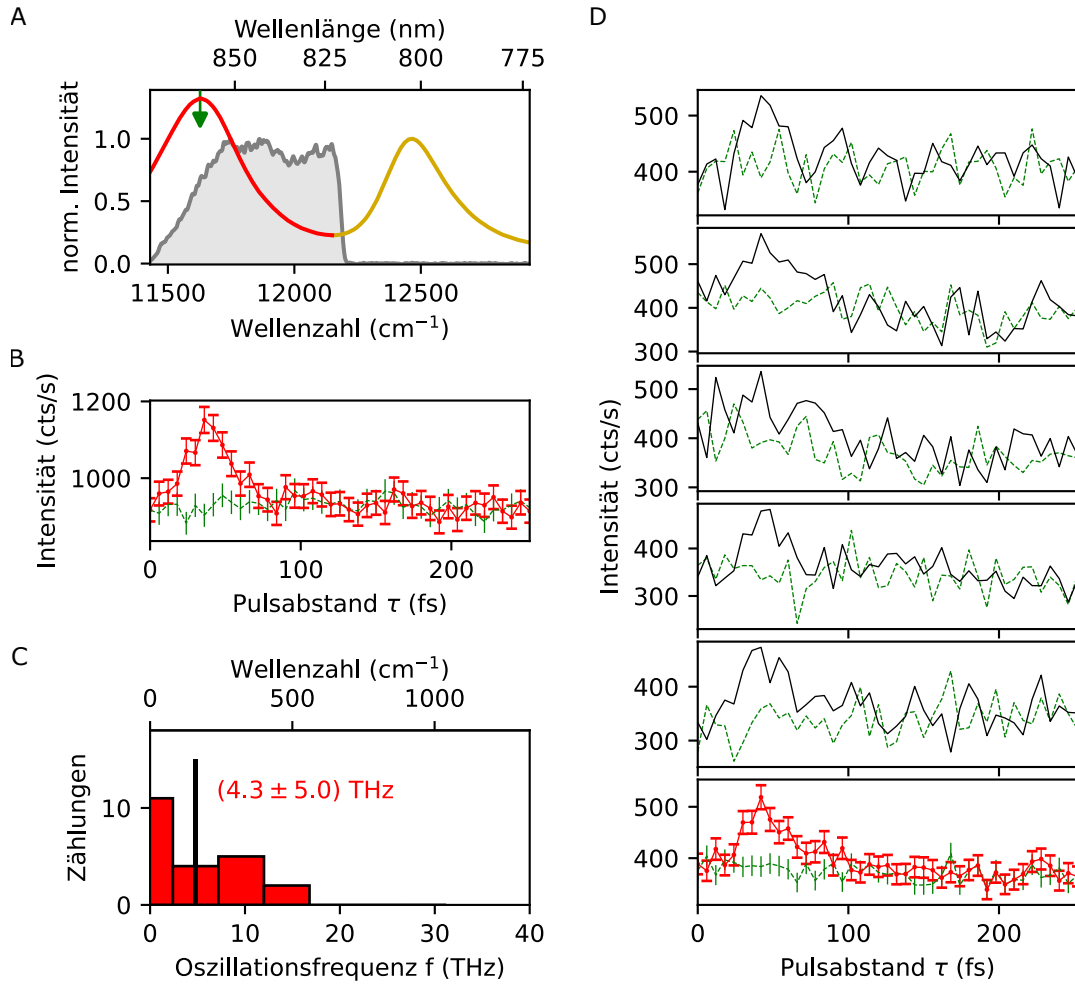


Abbildung 4.6: Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung der B850 Bande eines Ensembles und individueller LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* für $\Omega_L = 860$ nm. A) Spektrales Profil der Anregungspulse (graue Fläche), zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum des Ensembles mit aufgetragen (gelb bzw. rot für B800 bzw. B850 Bande). Der grüne Pfeil markiert die Lock-Frequenz Ω_L des Experiments. B) Fluoreszenzantwort eines LH2-Ensembles in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands der Anregungspulse. C) Statistik der durch Fourieranalyse ermittelten Modulationsfrequenzen 22 einzelner LH2 Komplexe. Der Mittelwert der Verteilung liegt bei 4,3 THz. Der schwarze Balken repräsentiert die Modulationsfrequenz einer Ensembles von LH2 Komplexen und liegt bei 4,8 THz D) Fluoreszenzantwort eines individuellen LH2-Komplexes in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands der Anregungspulse. Die schwarzen Kurven zeigen einzelne Scans, bei der die Pulse eine Phasendifferenz von $\Delta\varphi = 0$ aufweisen. Die Daten in rot stellen die Mittelung der Messwerte aus den Einzelsequenzen dar. Die grünen Kurven in B) und D) repräsentieren das Referenzexperiment.

Kapitel 5

Ultraschnelle Spektroskopie an low-light Lichtsammelkomplexen der Spezies *Rps. palustris*

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen an LH2-Komplexen der Spezies *Rps. palustris* aufgeführt. Die hier vermessenen Komplexe stammen von Bakterien, welche unter geringen Lichtbedingungen gezüchtet worden sind und werden als *low-light* (LL) LH2-Komplexe bezeichnet (siehe auch Kapitel 1.2). Diese Experimente stellen einen guten Vergleich zu den im vorherigen Kapitel dargestellten Messungen dar, da das System aus den selben Grundbausteinen besteht (neun-zähliger Proteinring mit 27 Bacteriochlorophyll *a* Molekülen angeordnet in zwei konzentrischen Ringen), jedoch im Vergleich zum vorherigen System unterschiedliche spektrale Eigenschaften besitzt (vgl. Abbildung 1.3).

5.1 Experimentelles

Zur Untersuchung der LL LH2-Komplexe werden Ensemble- und Einzelkomplex-Proben präpariert, wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben. Diese Proben werden umgehend in einer Vakuumzelle platziert und der Probenraum abgepumpt, um den Kontakt der LH2-Komplexe mit Sauerstoff zu minimieren und so ein Bleichen der Probe zu verhindern. Um einzelne Komplexe zu untersuchen wird das Anregungs- und Detektionsvolumen des Fluoreszenzmikroskops mit Hilfe des motorisierten Scanspiegels verfahren und so optimiert, dass das mit Hilfe der APD gemessene Emission maximal ist. Für Messungen an Ensembles ist keine spezifische Position in der homogenen Probe an-

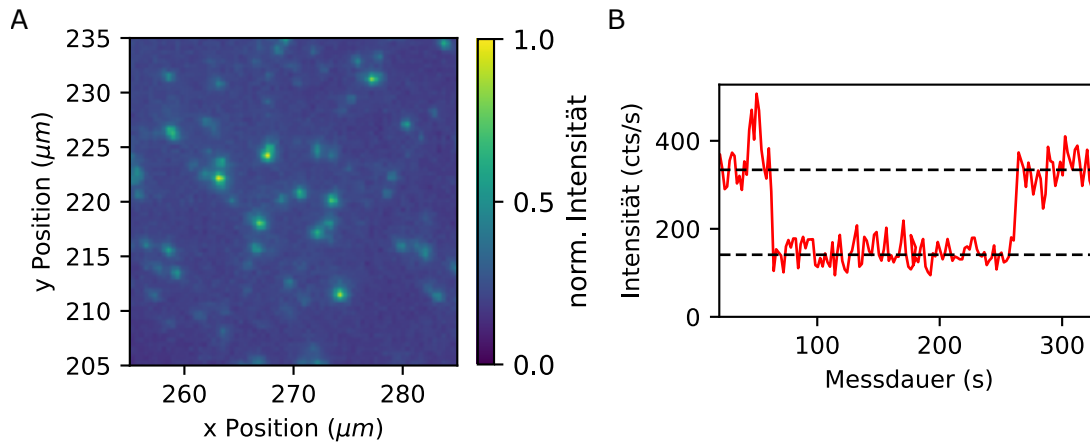


Abbildung 5.1: Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme und zeitliches Fluoreszenzsignal einzelner LL LH2 Komplexe von *Rps. palustris*. A) CCD-Detektion einer Einzelkomplex-Probe bei Weitfeldanregung. Die Belichtungsdauer beträgt 20 s. B) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzemission eines individuellen Komplexes. Der Wechsel von hoher Intensität auf Hintergrundsignal und zurück zeigen den Blinking-Effekt eines einzelnen Objekts.

gefahren worden. In beiden Fällen bleibt diese Position während der Messung unverändert. Durch entsprechende Positionierung der Prismen des Ti:Sa Lasersystems wird das Spektrum der Anregungspulse so justiert, dass es beide Absorptionsbanden der LH2-Komplexe abdeckt (siehe Abbildung 5.2A). Das so erzeugte Pulsspektrum besitzt eine Breite von ca. 1190 cm^{-1} bzw. 80 nm . Phasenstarre Pulspaare werden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, durch spektrale Pulsformung erzeugt, wobei die Lock-Frequenz für alle Experimente in diesem Abschnitt einer Wellenzahl von $12\,500\text{ cm}^{-1}$ bzw. einer Wellenlänge von 800 nm entspricht. Zusätzlich wird vor den Messungen die Korrektur der spektralen Phase durch MIIPS (siehe Kapitel 3.3) bestimmt und addiert, sodass die Anregung der Probe durch transform-limitierte Pulse am Ort der Probe erfolgt. Mit dem einjustierten Spektrum besitzt ein solcher Puls eine Pulsdauer von 21 fs . Wie schon bei den Experimenten an LH2-Komplexe der Spezies *Rps. acidophila* beträgt die zeitlich gemittelte Anregungsintensität $200\frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$, um ein lineares Anregungsregime zu gewährleisten. Zur Trennung der Fluoreszenz von gestreutem Anregungslicht werden drei dielektrische Filter (Langpass 885 nm) verwendet.

Wie bei den Experimenten an LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* (vgl. Kapitel 4.1, Abbildung 4.1) ist die Qualität der präparierten Einzelmoleküle im direkten Vorfeld der Messungen durch eine Weitfeldaufnahme der Probe überprüft worden. Abbildung 5.1A zeigt das Fluoreszenzsignal nach großflächiger Anregung der Probe,

gemessen durch die verwendete CCD Kamera. Die räumlich voneinander separierten weißen Punkte hoher Fluoreszenzintensität zeigen die einzelnen Komplexe der Probe. Als weiterer Test weisen manche beobachteten Stellen bei konfokaler Anregung und Emissionsdetektion mit der APD ein besonderes An-Aus-Verhalten der zeitlich aufgelösten Fluoreszenz auf (Abbildung 5.1B). Während zu Beginn der Aufzeichnung eine Intensität von ca. 350 Zählungen pro Sekunde (cps) zu beobachten sind, fällt das Signal abrupt auf den Untergrundwert von 120 cps. Nach etwa 200 s ist wieder ein höheres Signal zu beobachten, welches das gleiche Level erreicht, wie zu Beginn der Messung. Dieses Blinking-Verhalten deutet zusätzlich darauf hin, dass es sich bei den vermessenen Objekten um einzelne Komplexe handeln muss.

5.2 Ergebnisse

In Abbildung 5.2A sind das für die Messungen einjustierte Spektrum der Laserpulse (grau), sowie das gemessene Absorptionsspektrum eines Ensembles von LL LH2-Komplexen der Spezies *Rps. palustris* (gelb für die B800-Bande und rot für die B850-Bande) einzusehen. 5.3A ist die Statistik der daraus erhaltenen Oszillationsfrequenzen f aufgetragen. Mit den Anregungspulsen werden beide Absorptionsbanden spektral überlappt und somit im Experiment angeregt. Der grüne Pfeil repräsentiert die spektrale Position der für diese Messungen festgelegten Lock-Frequenz Ω_L .

Das Resultat des Doppelpulsexperiments an einer Ensemble-Probe von LH2-Komplexen ist in Abbildung 5.2B dargestellt. Die roten und blauen Datenpunkte bilden die Fluoreszenzantwort in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zweier Anregungspulse mit einer Phasendifferenz von $\Delta\varphi = 0$ bzw. $\Delta\varphi = \pi$ ab. Für $\Delta\varphi = 0$ zeichnet sich zunächst ein Anstieg der Fluoreszenz bis zu einem Höhepunkt bei $\tau = 30$ fs ab, anschließend fällt das Fluoreszenzsignal wieder ab, ist jedoch bis $\tau = 100$ fs höher, als das Referenzsignal (grün), welches man aus der Anregung mit einem transform-limitierten Puls gleicher Intensität erhält. Für längere Pulsabstände deckt sich das Fluoreszenzsignal der Anregung mit Pulspaaren dem Referenzsignal. Die Fluoreszenzantwort der Anregung mit Pulspaaren, deren Phase um 180° zueinander verschoben ist, zeigt einen spiegelverkehrten Verlauf, verglichen mit den Daten der phasengleichen Doppelpulse. An den Extremstellen (bei $\tau = 30$ fs) der Kurvenverläufe weisen die Daten eine um 14,5 % erhöhte, bzw. verminderte Fluoreszenz im Vergleich zu dem Fluoreszenzsignals des Referenzexperiments auf.

Abbildung 5.2C zeigt in den oberen fünf Panelen aufeinanderfolgende Sequenzen der

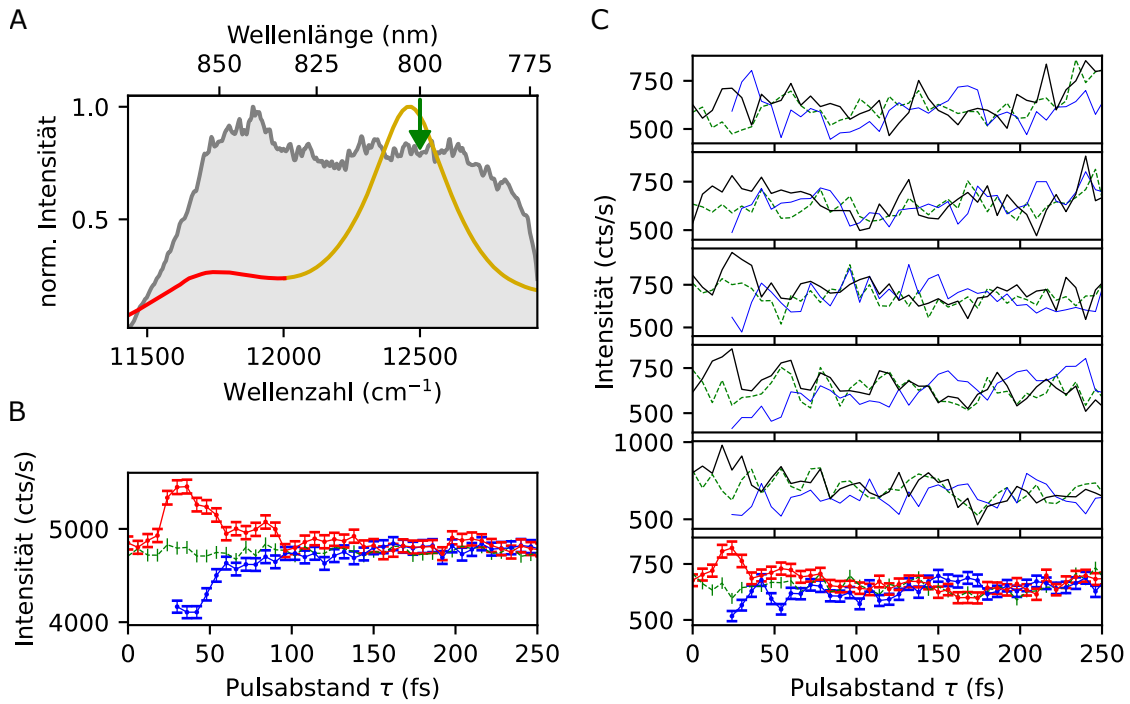


Abbildung 5.2: Fluoreszenzantwort nach Doppelpulsanregung eines Ensembles und individuellen LL LH2-Komplexes für *Rps. palustris*. A) Überlapp des Pulsspektrums (grau) mit der B800- und B850-Bande (gelb und rot). Der grüne Pfeil markiert die Lock-Frequenz Ω_L des Experiments. B) Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit des Pulsabstands τ zusammen mit einem Referenzsignal (grün) eines LL LH2 Ensembles. Die Phasenbeziehung zwischen den Pulsen beträgt $\Delta\varphi = 0$ (rot) bzw. $\Delta\varphi = \pi$ (blau). C) Fünf Einzelscans (schwarz und blau) und Mittelung der Einzelscans im untersten Panel (rot und blau) eines individuellen LL LH2 Komplexes. Schwarze und rote bzw. blaue Daten repräsentieren Messungen mit Phasenbeziehungen zwischen zwei Pulsen von $\Delta\varphi = 0$ bzw. $\Delta\varphi = \pi$.

Fluoreszenzmessung an dem selben individuellen LL LH2-Komplex in Abhängigkeit des Pulsabstands τ in schwarz (für die Phasendifferenz $\Delta\varphi = 0$) und blau (für $\Delta\varphi = \pi$). Im untersten Panel sind die Mittelwerte der fünf Einzelscans in rot bzw. blau abgebildet. Ähnlich dem Signal der Ensemble-Probe zeigt sich ebenfalls eine erhöhte, bzw. verminderte Fluoreszenz im Bereich kurzer Pulsabstände bis $\tau = 75$ fs, verglichen mit dem gemessenen Referenzsignal, dargestellt in grün. Der Verlauf des Signals für $\Delta\varphi = 0$ und $\Delta\varphi = \pi$ ist gegenläufig, bei steigendem Signal für $\Delta\varphi = 0$ fällt die Fluoreszenz für $\Delta\varphi = \pi$ und umgekehrt. Für $\tau > 75$ fs gleichen sich die Fluoreszenzsignale für phasengleiche und um π phasenverschobene Pulspaare mit dem Signal der Referenzmessung. Die Fluoreszenzantwort ist hier unabhängig vom zeitlichen Abstand der anregenden Pulse. Im Bereich der erhöhten Fluoreszenz lassen sich sowohl in der

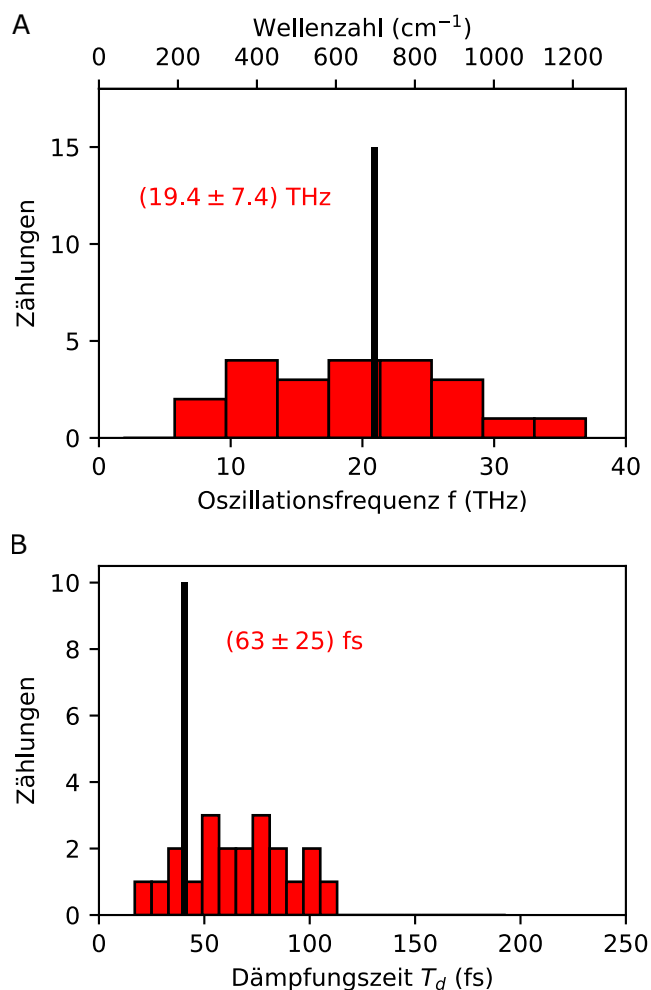


Abbildung 5.3: Statistik der Oszillationsfrequenzen und Dämpfungszeiten einzelner LH2-Komplexe der Spezies *Rps. palustris*. A) Histogramm der Modulationsfrequenzen f , erhalten aus der Fourieranalyse der Daten individueller Komplexe. B) Histogramm der Dämpfungskonstanten T_d aus dem Fit der Gl.(4.1) an die Messdaten. In beiden Diagrammen sind die statistischen Parameter der Verteilung (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) mit angegeben. Die schwarzen Balken repräsentieren Ergebnisse für die Messung an einem Ensemble von LH2-Komplexen und betragen 19,3 THz (A) und 40,6 fs (B).

Ensemble-Messung, als auch in dem Ergebnis für den individuellen Komplex schwache Modulationen der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von τ erkennen.

Insgesamt wurden 22 einzelne LL LH2-Komplexe der Spezies *Rps. palustris* auf diese Weise untersucht. Zur Bestimmung der Frequenzen der Fluoreszenzmodulationen wurde eine Fourieranalyse der gemessenen Signale durchgeführt. In Abbildung 5.3A ist in einem Histogramm die Statistik der erhaltenen Modulationsfrequenzen f aufgetragen.

Die Frequenzen verteilen sich über einen Bereich von 6,5 THz (217 cm^{-1}) bis 35 THz (1167 cm^{-1}). Die Analyse eines Ensembles von LL LH2 Komplexen ergibt eine Modulationsfrequenz von 20,9 THz (schwarze Linie) und deckt sich unter Berücksichtigung der Messunsicherheiten mit dem Mittelwert der Verteilung der Modulationsfrequenzen von 19,4 THz (647 cm^{-1}).

Die Dämpfung des modulierten Signal mit zunehmendem zeitlichen Abstand τ der Anregungspulse (vgl. Abbildung 5.2B und C) ist mit Hilfe von Gl.(4.1) durch Fitten der Modellfunktion an die Messergebnisse ausgewertet worden, woraus die Verteilung der Dämpfungszeit T_d in Abbildung 5.3B abgeleitet werden konnte. Bei der Analyse der Dämpfungen ist die zuvor ermittelte Modulationsfrequenz f des jeweiligen individuellen Komplexes als fester Parameter in Gl.(4.1) verwendet worden, während Amplitude und Phasenverschiebung der Kosinusfunktion freie Parameter sind, die nicht weiter ausgewertet worden sind. Die Dämpfungszeiten verteilen sich über einen Bereich von 11,1 fs bis 108 fs um einen Mittelwert von 63,3 fs. Aus einer Ensemblemessung (schwarze Linie) konnte eine Dämpfungszeit von 40,6 fs ermittelt werden.

Kapitel 6

Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Kapitel werden im Folgenden interpretiert und miteinander verglichen.

Zunächst soll auf den Ursprung der im Fluoreszenzsignal beobachteten Modulationen in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands der Anregungspulse eingegangen werden. Hierbei wird auf den Ablauf des Experiments und die währenddessen ablaufenden physikalischen Prozesse Bezug genommen (Kapitel 6.1).

Anschließend wird die Dynamik der beobachteten Fluoreszenzmodulationen von Messungen an ein und demselben LH2 Komplex diskutiert und Bezug zu dem zugrunde liegenden Exzitonmodell von LH2 Komplexen gezogen (Kapitel 6.2).

Die Ergebnisdiskussion der Experimente an Lichtsammelkomplexen der Bakterienart *Rps. acidophila* sind in dem Paper „*Fluorescence-detected Wavepacket Interferometry reveals time-varying Exciton Relaxation Pathways in single Light-Harvesting Complexes*“ veröffentlicht worden [90].

6.1 Wellenpaket Interferenz in LH2 Komplexen

Bei der Doppelpulsanregung einzelner LH2-Komplexe wird die Probe von zwei ultrakurzen Laserpulsen, die einen festen zeitlichen Abstand zueinander besitzen, angeregt. Durch den ersten Puls wird dabei eine kohärente Superposition zwischen dem Grundzustand und allen optisch erlaubten angeregten Zuständen erzeugt, sofern diese auch durch das Profil des Pulsspektrums abgedeckt werden. Somit entsteht ein Exziton-Wellenpaket. Für die Experimente, welche in Abschnitt 4.1 und in Kapitel 5 beschrieben sind, setzt sich ein solches Wellenpaket sowohl aus Anteilen der angeregten Zustände

der B850-Bande, als auch den möglichen Zuständen der BChl *a* des B800-Rings zusammen. Für die Szenarios in Kapitel 4.2 beschränkt sich das Exziton-Wellenpaket auf die B850-Bande, da das anregende Pulsspektrum hier nur mit den energieärmeren Zustände überlappt. Für das Modell eines Wellenpakets in LH2-Komplexen soll ein einfacher Ansatz gewählt werden und die angeregten Zustände mit $|\psi_{800}\rangle$ für die mitwirkenden Zustände der B800-Bande, $|\psi_{850}^h\rangle$ für die höher-energetischen Zustände des B850-Exzitonbandes und $|\psi_{800}^e\rangle$ für die dessen emittierenden Zustände beschrieben. $|\psi_{850}^h\rangle$ enthält zusätzlich Zustände mit CT-Charakter [93]. Für das Wellenpaket gilt dann:

$$|\Psi_{WP}\rangle = \sum_i c_i(t) |\psi_i\rangle, \quad (6.1)$$

mit $i = \{800, 850^h, 850^e\}$. Für die Experimente in Kapitel 4.2 gilt dann, wie zuvor beschrieben $c_{800}(t) = 0$.

Das erzeugte Wellenpaket entwickelt sich zeitlich, nach der Wechselwirkung zwischen dem ersten Puls mit LH2-Komplex, unter ungestörten Bedingungen. Die einzelnen spektralen Anteile $|\psi_i\rangle$ bilden eine zeitabhängige Phase $\phi(t)$, für die gilt:

$$\phi(t) = -i(\Omega_L - \omega_i)t, \quad (6.2)$$

wobei Ω_L der Lock-Frequenz der erzeugten Pulse entspricht, und die spektralen Energien der Anteile i mit $\hbar\omega_i$ ausgedrückt werden. Die Energie oszilliert zwischen den beteiligten Zuständen. Zusätzlich relaxiert Population aus den höheren Energiezuständen in die niedrigeren. Dies kann sowohl zu einer Dephasierung im System führen, oder auch eine Phasenverschiebung $e^{i\zeta}$ mit sich bringen [47].

Nach dem definierten Pulsabstand τ interagiert das System mit dem zweiten Anregungspuls. Dieser erzeugt ein zweites Wellenpaket, mit den Phasen:

$$\phi(t + \tau) = -i[(\Omega_L - \omega_i)(t + \tau) + \Delta\varphi] \quad (6.3)$$

$\Delta\varphi$ drückt einen zusätzlichen Phasenfaktor aus, der die Phasendifferenz zwischen den beiden Anregungspulsen beschreibt. In den Abbildungen 4.2 und 4.4, sowie Abbildung 5.2 sind Ergebnisse eines solchen Experiments mit einer vorgegebenen Phasendifferenz $\Delta\phi = \pi$ in blau als Kontroll-Experiment dargestellt. Für alle sonstigen Experimente ist der Phasenunterschied zwischen den Anregungspulsen auf $\Delta\varphi = 0$ festgelegt. Die beiden erzeugten Wellenpakete können nun miteinander interferieren, wobei jede spektrale Komponente des zweiten Wellenpakets eine feste Phasendifferenz zu der gleichen spektralen Komponente des ersten Wellenpakets besitzt. Die Höhe der Population des

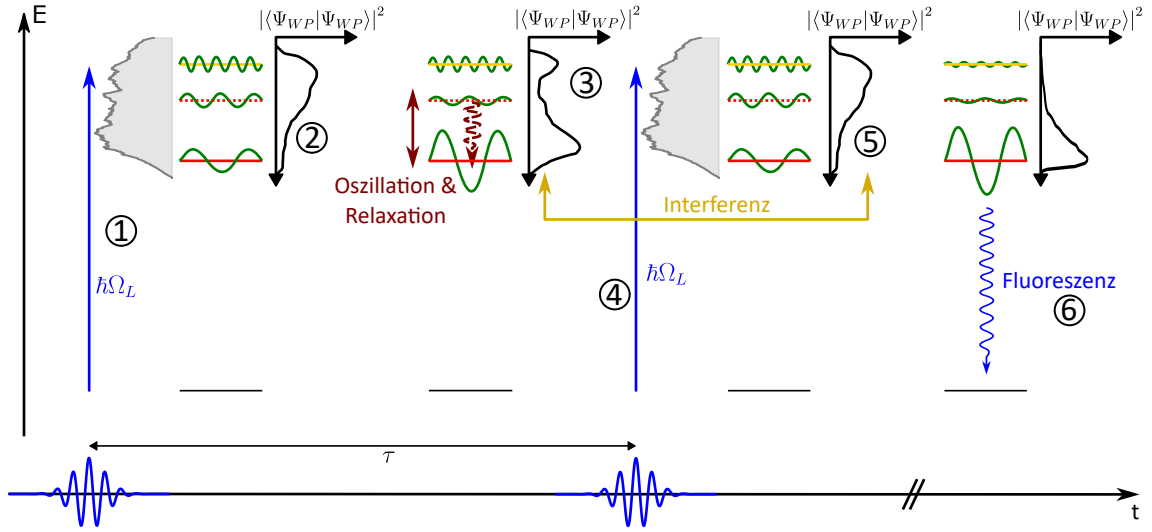


Abbildung 6.1: Interferenz von Exziton-Wellenpaketen in LH2-Komplexen.

Von links nach rechts ist der zeitliche Ablauf schematisch dargestellt, die Zeitachse unten zeigt den zeitlichen Abstand τ der mit dem System interagierenden Pulse. Das vereinfachte Energieniveauschema zeigt die Energiezustände $|\psi_{800}\rangle$ (gelb), $|\psi_{850}^h\rangle$ (gestrichelt rot) und $|\psi_{850}^e\rangle$ (durchgezogen rot). ① Das Pulsspektrum (grau) erzeugt ein Wellenpaket $|\Psi_{WP}\rangle = c_{800}|\psi_{800}\rangle + c_{850}^h|\psi_{850}^h\rangle + c_{850}^e|\psi_{850}^e\rangle$, die Amplituden der spektralen Komponenten sind durch grüne Wellen ausgedrückt. ② bildet die Wahrscheinlichkeit $|\langle\Psi_{WP}|\Psi_{WP}\rangle|^2$ ab. ③ Während der Wartezeit τ findet eine zeitliche Entwicklung des Wellenpaketes statt, die Population oszilliert und relaxiert. ④ Durch den zweiten Puls wird ein zweites Wellenpaket erzeugt. Beide Anregungspulse besitzen eine Lock-Frequenz Ω_L , die durch den blauen Pfeil dargestellt ist. ⑤ Die Wellenpakete interferieren miteinander. ⑥ Die Populationen nach der Interferenz relaxieren in den emittierenden Zustand, die Höhe des Fluoreszenzsignals korrespondiert mit der Population.

emittierenden Zustand $|\psi_{850}^e\rangle$, in den die Energie letztendlich relaxiert, hängt von der vorherigen konstruktiven oder destruktiven Interferenz der Wellenpakete ab, und stellt sich durch die resultierende spontane Emission dar. Aufgrund der Phasenbeziehung in Gl.(6.3) hängt das Fluoreszenzsignal somit von dem zeitlichen Abstand τ der beiden Anregungspulse ab.

Die Population kann durch die Summe der erzeugten Wellenpakete $|\Psi_{WP1} + \Psi_{WP2}\rangle$ nach dem ersten (WP1) bzw. zweiten Anregungspuls (WP2) beschrieben werden, somit ergibt sich für das Signal F_{tot} [94]:

$$\begin{aligned} F_{tot} &\propto \langle\Psi_{WP1} + \Psi_{WP2}|\Psi_{WP1} + \Psi_{WP2}\rangle \\ &= \Psi_{WP1}^2 + \Psi_{WP2}^2 + \Psi_{WP1}^* \Psi_{WP2} + \Psi_{WP1} \Psi_{WP2}^* \end{aligned} \quad (6.4)$$

Die beiden ersten Terme beschreiben die Pulsabstand-unabhängige Signal, während die letzten beiden Terme die Interferenz der Wellenpakete beschreiben. Mit den Phasen aus Gl.(6.2) und (6.3) erhält man so:

$$\Psi_{WP1}\Psi_{WP2}^* = \sum_i c_i e^{i(\Omega_L - \omega_i)t} \cdot \sum_j c_j^* e^{-i[(\Omega_L - \omega_i)(t+\tau) + \Delta\varphi]}, \quad (6.5)$$

was sich letztendlich zusammenfassen lässt zu:

$$\Psi_{WP1}\Psi_{WP2}^* \approx \sum_{i,j} c_i c_j^* e^{-i[(\Omega_L - \omega_i)\tau + \Delta\varphi]} \quad (6.6)$$

Daraus resultiert für die interferierenden Komponenten in Gl.(6.4):

$$F_{int}(\tau) = \Psi_{WP1}^* \Psi_{WP2} + \Psi_{WP1} \Psi_{WP2}^* = 2 \sum_{i,j} c_i c_j^* \cos [(\Omega_L - \omega_i) \tau + \Delta\phi] \quad (6.7)$$

Dies bekräftigt, dass das beobachtete Fluoreszenzsignal zeitlich mit dem Abstand τ der Anregungspulse moduliert. Des Weiteren zeigt Gl.(6.7), dass die Oszillationsfrequenz der gemessenen Fluoreszenzmodulationen vom energetischen Abstand der beteiligten Zustände (ω_i) zu der für das jeweilige Szenario festgelegten Lock-Frequenz Ω_L abhängt. Die Ergebnisse der Anregungen der B850-Bande mit unterschiedlichen Lock-Frequenzen weisen darauf hin, dass in den gezeigten Experimenten hauptsächlich die niederenergetischen Exzitonzustände der B850-Bande mit hohen Oszillationsstärken bei der Erzeugung der Wellenpakete beteiligt sind. Für $\Omega_L = 800$ nm sind hohe Modulationsfrequenzen gemessen worden ($\bar{f} \approx 21,4$ THz), wird die Lock-Frequenz in Richtung B850-Bande verschoben, so wird auch die beobachtete Oszillationsfrequenz kleiner ($\bar{f} \approx 8,7$ THz für $\Omega_L = 840$ nm und $\bar{f} \approx 4,3$ THz für $\Omega_L = 860$ nm). Diese Schlussfolgerung soll im Nachfolgenden genauer diskutiert werden.

Durch den direkten Kontakt der LH2-Komplexe zur Umgebung kommt es aus verschiedenen Gründen zu Fluktuationen und Konformationsänderungen des Proteingerüsts der Komplexe. Dadurch ändern sich die Energien der einzelnen BChl *a* Moleküle des Systems und somit auch die Exziton-Zustände. Dies hat zur Folge, dass auch die Energien $\hbar\omega_i$ der spektralen Anteile der Wellenpakete fluktuieren und können sich im Zeitraum zwischen den beiden Pulsen verändern. Bei der Realisierung der Doppelpulsanregung handelt es sich um ein repetitives Experiment, da in einem Mittelungszeitraum mehrere Pulspaaranregungen durchgeführt werden und die resultierende Fluoreszenz aufsummiert wird. Dadurch ergibt sich die Bedingung, dass die Summe der Korrelationen in

diesem Zeitraum t_{av} nicht verschwinden darf [81]:

$$\sum_i \langle \delta\omega_i(\tau, 0) \cdot \delta\omega_i(\tau, t) \rangle_t \neq 0 \quad (6.8)$$

Diese Annahme gilt ebenfalls für andere repetitive Experimente, wie z.B. bei der Zweidimensionale Spektroskopie (2DES) [95, 96]. Eine ausführliche Beschreibung der Zeitskalen solcher Energiefluktuationen und die Auswirkung auf Messergebnisse ist in Anhang A.5 einzusehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es für Pulsabstände τ von bis zu 100 fs zur Interferenz zwischen den Wellenpaketen kommt, was an den vorhandenen Fluoreszenzmodulationen erkennbar ist. Die Phasen der Wellenpakete bleiben auf dieser Zeitskala robust gegenüber den Fluktuationen. Für längere Pulsabstände verschwinden auch die Modulationen der Fluoreszenz, die Phasenbeziehungen gehen verloren und es kommt nicht zur Interferenz zwischen den Wellenpaketen. Die Verteilung der gemessenen Dämpfungszeiten zeigen, dass die Wechselwirkung mit der Umgebung und die daraus entstehenden Fluktuationen sehr heterogen sind und so die individuelle Konformation des Proteingerüsts und dessen Fluktuationen darstellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Messungen an LH2 Komplexen von *Rps. acidophila* miteinander, bei der beide, bzw. nur die B850-Bande mit einer Lock-Frequenz $\Omega_L = 800$ nm angeregt werden, so lässt sich erkennen, dass die Verteilungen der Modulationsfrequenzen und der Dämpfungszeiten innerhalb der statistischen Genauigkeit gleich sind. Daraus lässt sich schließen, dass die Beteiligung der angeregten B800 Zustände keine signifikante Rolle spielen. Dies lässt sich aufgrund der beobachteten Relaxationszeiten zwischen B800 und B850 Zuständen erklären, welche im Bereich von ~ 1 ps liegen [97–100]. Diese Relaxationszeiten sind deutlich länger, als die in dieser Arbeit implementierten Abstände der Anregungspulse.

Anders verhält es sich mit der gewählten Lock-Frequenz Ω_L , was am Vergleich der Messungen in Kapitel 4.2 (Anregung der B850 Bande bei $\Omega_L = 800$ nm und $\Omega_L = 840$ nm) zu erkennen ist. Durch die Variation der Lock-Frequenz verändert sich die Realisierung der Wellenpakete, genauer gesagt der zeitabhängigen Koeffizienten $c_i(t)$ der beteiligten Exzitonenzustände. Daraus resultiert veränderten Interferenzen der Wellenpakete und führt zu den signifikant unterschiedlichen Modulationen. Die in den Emissionssignalen beobachtete Modulationsfrequenz bestimmt sich aus der Differenz zwischen der Lock-Frequenz und den beteiligten Exzitonenzuständen. In der B850 Bande besitzen im Wesentlichen nur die Energie-niedrigen Zustände $k = 0, \pm 1$ Oszillatorenstärke mit dem

Grundzustand, was die statistisch gesehen gleichen Mittelwerte von $\bar{f} \approx 700 \text{ cm}^{-1}$ für die Anregung beider Banden bzw. nur der B850 Bande bei einer Lock-Frequenz von $\Omega_L = 800 \text{ nm}$ erklärt. Wird die Lock-Frequenz in Richtung der beteiligten Exziton-zuständen verschoben, so ändert sich auch die beobachtete Modulationsfrequenz, was sich in Abbildung 4.5 mit einer mittleren Frequenz von $\bar{f} \approx 290 \text{ cm}^{-1}$ zeigt.

In Kapitel 4.2.3 sind die Ergebnisse eines Referenzexperimentes dargestellt, bei dem ebenfalls nur die B850 Bande durch das Pulsspektrum angeregt wird, die Lock-Frequenz weiter Richtung B850 Bande verschoben (Ω_L äquivalent zu 860 nm). Die Differenz zwischen der Lock-Frequenz und den spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonzustände geht dadurch gegen 0, was zur Folge hat, dass die der Beitrag zu den Fluoreszenzmodulationen verschwindet. Hingegen werden Oszillationsbeiträge erkennbar, welche sich auf die Differenz zwischen Lock-Frequenz und höheren Exzitonzuständen zurückführen lassen (vgl. Abbildung 6.2D). Diese Modulationen der Emission besitzen im Vergleich mit den zuvor betrachteten Szenarien eine geringe Amplitude. In allen Fällen wird die Modulationsfrequenz durch den stärksten Beitrag der B850-Komponente $c_i(t)$ bestimmt.

Auch der Vergleich der Ergebnisse bei Anregung beider Banden von LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* (Kapitel 4.1) und LL LH2 Komplexen der Spezies *Rps. palustris* (Kapitel 5.2) weisen unterschiedliche Verteilungen der Fluoreszenzmodulationen auf. Während die Ergebnisse bei *Rps. acidophila* wie bereits beschrieben die Beteiligung der niedrigsten Exzitonzustände nach Relaxation der Energie widerspiegelt, sind die Modulationsfrequenzen bei *Rps. palustris* breiter verteilt und die Modulationsamplituden schwächer ausgeprägt. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Oszillatorenstärke der *palustris*-B850 Absorptionsbande niedriger ist, als bei *Rps. acidophila*. Dadurch sind auch Beiträge zu den durch die Anregung erzeugten, interferierenden Exzitonwellenpaketen geringer. Die ähnlich hohe Oszillatorenstärke im Bereich der B850 Bande sorgt zudem dafür, dass sich die ermittelten Modulationsfrequenzen über einen breiteren Bereich verteilen.

6.2 Spektrale Diffusion

Die in Abbildungen 4.3, 4.5 und 5.3 dargestellten Ergebnisse bilden die Heterogenität der Modulationsfrequenzen und damit der Energierelaxationspfade individueller LH2 Komplexe ab. Zudem zeigen vereinzelte Messungen, dass es ebenfalls Variationen der Modulationsfrequenz zwischen den Messsequenzen eines bestimmten einzelnen

Komplexes gibt. Dieses Resultat liefert die Fourieranalyse der einzelnen Messsequenzen an ein und dem selben individuellen LH2 Komplex. Beispiele solcher Messungen sind in Abbildung 6.2 dargestellt und ausgewertet. In allen Diagrammen spiegelt die vertikale grüne Linie die Position der Lock-Frequenz Ω_L wider, horizontale Linien in schwarz, rot oder blau repräsentieren die Differenz $\Delta\Omega = \Omega_L - f$, wobei f die aus der Fourieranalyse erhaltene Modulationsfrequenz der einzelnen Messsequenz ist. Fünf Linien einer Farbe entsprechen den fünf Sequenzen eines individuellen Komplexes, die Punkte sind mit gestrichelten Linien verbunden, um den zeitlichen Verlauf von $\Delta\Omega$ darzustellen. Die Darstellungen zeigen zusätzlich die Pulsspektren zur Anregung in grau, sowie das Raumtemperatur-Ensemblespektrum von LH2 Komplexen der jeweiligen Bakterienspezies (gelb und rot für die B800, bzw. B850 Bande). So sind in den Bildern 6.2A-D die Messungen an LH2 Komplexen von *Rps. acidophila* für die in Kapitel 4 beschriebenen Experimente dargestellt. Des Weiteren sind die Positionen der Exzitonzustände als rote Balken unterhalb der B850 Bande eingezeichnet. Diese sind durch Studien an einzelnen LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* bei 1,4 K in einer früheren Forschungsarbeit ermittelt worden [19]. Die Messungen und Ergebnisse sind in Kapitel A.6 ausführlicher erläutert. Abbildung 6.3 vergleicht die Ergebnisse der Messungen beider Banden von LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* (A) und LL LH2 Komplexen von *Rps. palustris* (B). Die spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonzustände in den LL LH2 Komplexen der Spezies *Rps. palustris* sind aus den Ergebnissen von Anregungsspektroskopie bei 1,4 K abgeleitet worden [12]. Hier bildet die Position der energieärmsten beobachteten Absorptionsbande die Basis, die Statistik der Energiedifferenzen dieser Bande zu drei weiteren Banden lassen die Positionen und Standardabweichungen der energiereicheren Banden abschätzen (vgl. rote Balken in Abbildung 6.3B, für Details siehe Anhang Kapitel A.6).

Wie in allen dargestellten Messungen zu sehen ist, sammeln sich die Werte von $\Delta\Omega$ im Bereich der spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonzustände $k = 0, \pm 1$, welche zugleich die größte Oszillatorenstärke mit dem Grundzustand besitzen. Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, da durch die Anregung der Komplexe Wellenpakete erzeugt werden, die aus einer Superposition von Exzitonzuständen bestehen, wobei solche höher ins Gewicht fallen, die eine größere Oszillatorenstärke mit dem Grundzustand des Systems aufweisen. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass die Temperatur nur einen geringen Einfluss auf die Position der niedrigsten Exzitonzustände hat, da die in den Abbildungen 6.2 und 6.3 gezeigten spektralen Positionen der niedrigen k -Zustände sind aus Tieftemperatur-Messungen, die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sind

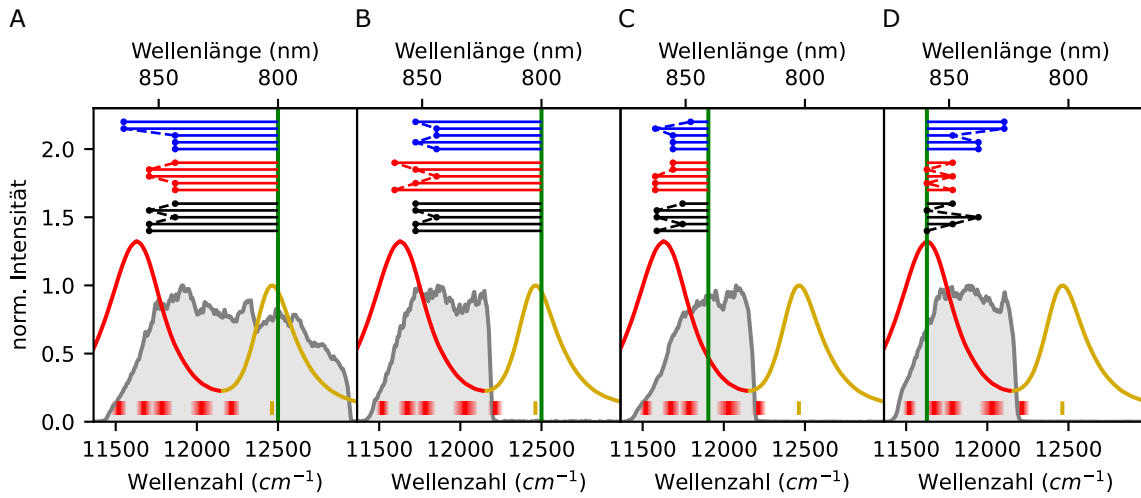


Abbildung 6.2: Änderung der Modulationsfrequenz eines individuellen Komplexes über fünf Messsequenzen hinweg, bei unterschiedlichen Anregungsbedingungen. Darstellung einzelner Beispiele für die spektrale Diffusion in LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* bei der Anregung von beiden Absorptionsbändern ($\Omega_L = 800$ nm) (A), nur der B850 Bande mit $\Omega_L = 800$ nm (B), $\Omega_L = 840$ nm (C), sowie $\Omega_L = 860$ nm (D). Horizontale Linien in schwarz, rot und blau sind Beispiele der Modulationsfrequenzen einzelner Komplexe, die grüne vertikale Linie repräsentiert die Position der Lock-Frequenz Ω_L . Zur Veranschaulichung sind unter den Beispielen die Absorptionsbanden und die Pulsspektren der jeweiligen Experimente abgebildet. Zusätzlich werden die Bereiche der spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonzustände in rot dargestellt (unten). Details siehe Text.

aus Raumtemperatur-Messungen erhalten worden. Des Weiteren lässt sich aus der Änderung der Modulationsfrequenzen schließen, dass sich die Population der beteiligten Exzitonzustände der interferierenden Wellenpakete von einer Messsequenz zur nächsten, also auf einer Zeitskala von ca. 10 ps, ändert. Daraus und aus den Erkenntnissen aus dem vorherigen Kapitel 6.1 geht hervor, dass die Relaxationspfade auf der selben Zeitskala variieren müssen.

Die Energielücken zwischen den Exzitonzuständen müssen durch Fluktuationen des umgebenden Bades überbrückt werden. Dazu ist bekannt, dass der Energietransfer innerhalb von Pigment-Protein-Komplexen im Bereich mittelstarker Wechselwirkung zwischen den beteiligten Chromophoren am effizientesten ist, da hier die Kopplung zwischen den Chromophoren in der gleichen Größenordnung, wie die Reorganisationsenergie λ liegt [34, 101, 102]. Diese lässt sich durch den Huang Rhys Faktor S , die Planck-Konstante h und die Energie ν_{vib} der an den elektronischen Zustand koppelnden Vibrationsmode

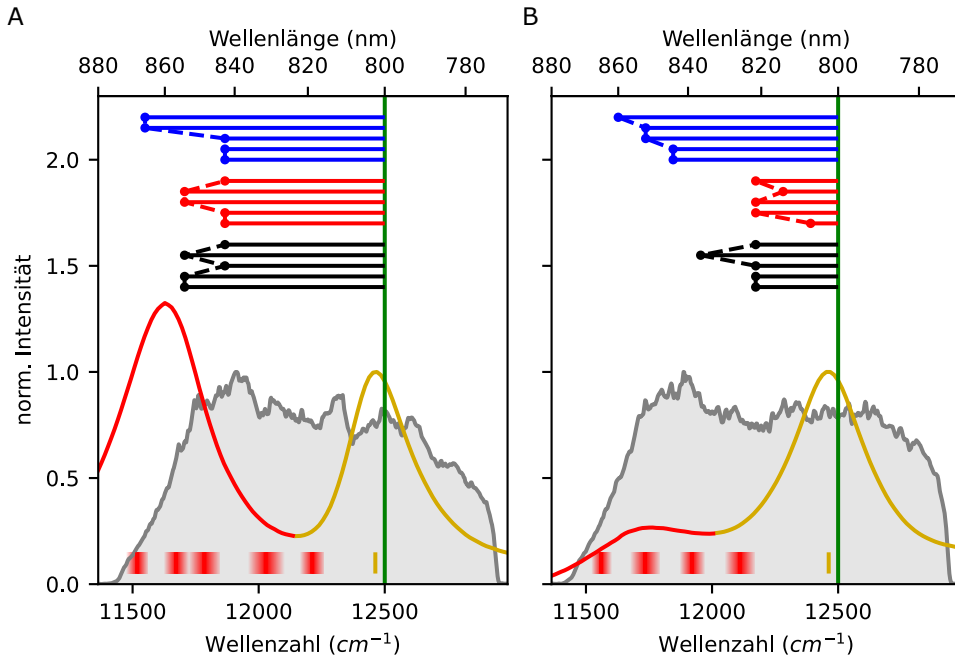


Abbildung 6.3: Änderung der Modulationsfrequenz eines individuellen Komplexes über fünf Messsequenzen hinweg für LH2 Komplexe unterschiedlicher Spezies. Darstellung einzelner Beispiele für die spektrale Diffusion in LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* (A) und LL H2 Komplexen der Spezies *Rps. palustris* (B) bei der Anregung beider Absorptionsbanden ($\Omega_L = 800$ nm). Horizontale Linien in schwarz, rot und blau sind Beispiele der Modulationsfrequenzen einzelner Komplexe, grüne vertikale Linien repräsentieren die Position der Lock-Frequenz Ω_L . Zur Veranschaulichung sind unter den Beispielen die Absorptionsbanden und die Pulsspektren der jeweiligen Experimente abgebildet. Zusätzlich werden die Bereiche der spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonzustände in rot dargestellt (unten). Details siehe Text.

ausdrücken:

$$\lambda = Sh\nu_{vib} \quad (6.9)$$

Der Huang Rhys Faktor ist als Funktion der Wellenlänge für Übergänge von B850 Zuständen in den Grundzustand durch *differential fluorescence line narrowing* auf Werte zwischen 1 und 2 ermittelt worden [103]. Theoretische Modelle wiederum liefern Werte im Bereich von $S = 0,48 \dots 2,8$ [104], was durch Einzelmolekülspektroskopie bestätigt werden konnte [105, 106]. Diese Werte korrespondieren mit Elektron-Phonon-Kopplungen im Grundzustand, es kann jedoch angenommen werden, dass der Huang Rhys Faktor in angeregten Zuständen ähnlich große Werte besitzt. Die starke Kopplung zwischen Chromophoren im B850 Ring beträgt 200 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} [4]. Daraus folgt, dass Vibrationen mit Energien zwischen 100 cm^{-1} und 300 cm^{-1} an elektronische

Zustände koppeln, was im Einklang mit fehlenden höherfrequenten Vibrationsbanden in Fluoreszenzspektren von LH2 Komplexen [105, 107]. Zudem ist festgestellt worden, dass der Huang Rhys Faktor für individuelle Komplexe auf eine Sekunden-Zeitskala zwischen den oben beschriebenen Grenzen variieren kann [106]. Aus diesen Erkenntnissen schließt sich die Annahme, dass die beobachteten Fluktuationen der Relaxationspfade mit strukturellen Änderungen des Proteingerüsts an den Bindungsstellen der BChl *a* Chromophore zusammenhängt. Diese Annahme steht im Einklang mit Ergebnissen aus früheren Studien, bei welchen strukturelle Fluktuationen auf ähnlichen Zeitskalen wie in dieser Arbeit beobachtet werden konnten [38, 40–42, 45, 66, 108]. Die zeitlichen Variationen der Mikroumgebung einzelner BChl *a* Moleküle beeinflusst die Energie der angeregten Zustände der Chromophore [109]. Im Zusammenspiel aller 27 Moleküle bzw. mindestens der Moleküle des B850 Rings ändert sich dadurch zusätzlich die Abstände und Kopplungen zwischen den Chromophoren, was wiederum Fluktuationen der Energielandschaft der Exzitonzustände zur Folge hat .

Für viele Lichtsammelkomplexe photosynthetischer System konnte beobachtet werden, dass die Energiezustände der intramolekularen Vibrationen dem Abstand der Exzitonzustände gleichen [110–114]. Daraus ist die Hypothese entstanden, dass hierbei kein kausaler Zusammenhang bestehen muss, jedoch erlaubt dies dem elektronischen System die Nutzung von Kernfluktuationen, um eine möglichst effiziente Relaxation der Energie zwischen den angeregten Zuständen zu gewährleisten [95, 110]. Zudem ermöglicht die Wechselwirkung zwischen Vibrationszuständen und elektronischen Zuständen den Exzitonzuständen die Nutzung der Kohärenzen von Schwingungen. Mit dieser Annahme sind bereits in früheren Forschungsarbeiten die Beobachtung von langlebigen Oszillationen in Signalen von 2DES-Experimenten begründet worden. Der Ursprung dieser Oszillationen allerdings hängt mit hoher Wahrscheinlichkeit von Vibrations- bzw. vibronischen Kohärenzen zusammen, welche keine Rolle in der Funktion von Lichtsammelkomplexen spielen [115, 116]. Die Idee, dass effiziente Energierelaxation in LH2 Komplexen innerhalb der B850 Exzitonzustände auf den Resonanzbedingungen Exzitonabstände und Vibrationsmoden beruht, ist zuletzt durch 2DES-Experimente an LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* in Frage gestellt worden [117]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen jedoch im Einklang mit den Ergebnissen aus [117] darauf hin, dass in der Natur die Energielandschaft der angeregten Zustände von peripheren Lichtsammelkomplexen so erhalten wird, dass sie robust gegen strukturelle Veränderungen des Systems ist, indem auf verfügbare niederfrequente intra- und intermolekulare Schwingungen zurückgegriffen wird. Dies gewährleistet eine effiziente Relaxation der

Energie in die emittierenden B850 Zustände für jeden individuellen Komplex, zu jedem Zeitpunkt. Dies wird zum einen dadurch bestätigt, dass die Exzitonenzustände für verschiedene Komplexe variieren kann (vgl. Abbildung A.6), während die Energien der intramolekularen Vibrationen kaum variierende Werte aufweisen. Dadurch kann für viele Komplexe die Energiedifferenz zwischen den Exzitonenzuständen nicht überwunden werden. Zudem sind für die exklusive Anregung der B850 Bande der Spezies *Rps. acidophila* bei einer Lock-Frequenz Ω_L äquivalent zu 840 nm deutlich längere Dämpfungszeiten festgestellt worden, als für die beiden Szenarien mit $\Omega_L = 800$ nm. Dabei sind ebenfalls die niedrigsten Modulationsfrequenzen beobachtet und folglich die niedrigste Energie an die Umgebung abgegeben worden. Unabhängig von der Zustandsdichte der niederfrequenten Moden, skaliert die Zustandsdichte (linear oder in dritter Ordnung) mit der Frequenz der Phononen [118–121]. Dass heißt, je kleiner die Energiedifferenz zwischen den Exzitonenzuständen ist, desto weniger Phononenmoden sind zugänglich, welche die Energie aufnehmen. Dies hat zur Folge, dass die Dephasierung der Exzitonwellenpakete langsamer von statten geht.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war es, die Fluoreszenzantwort in Folge von Anregung individueller peripherer Lichtsammelkomplexe mit phasenstarren Doppelpulsen zu visualisieren und in einen physikalischen Kontext zu bringen. Dazu sind in dieser Arbeit einzelne LH2 Komplexe der unter high-light Bedingungen gezüchteten Purpurbakterienspezies *Rhodopseudomonas acidophila*, sowie der unter low-light Bedingungen gewachsenen Spezies *Rhodopseudomonas palustris* untersucht worden.

Der Aufbau eines dafür erforderlichen Fluoreszenzmikroskops und dessen Kalibration stellt einen wichtigen vorbereitenden Teil der Arbeit dar. Zur Erzeugung und Manipulation von ultrakurzen Laserpulsen, die zur Anregung der LH2 Komplexe diente, wurde ein Ti:Sa Lasersystem, welches spektral breitbandige Pulse erzeugt, mit einem spektralen Pulsformer kombiniert (Kapitel 3). Letzterer sorgte sowohl für eine weitere Komprimierung der ausgestrahlten Pulse, sowie für die Erzeugung der zur Anregung verwendeten phasenstarren Pulspaare. Durch die Verwendung des Pulsformers konnten spezifische Phasen und Amplitudenmasken implementiert werden, mit denen der zeitliche Abstand der Pulse, sowie deren Phasenbeziehung kontrolliert werden konnte. Dadurch konnten Experimente zur Messung des Fluoreszenzsignals einzelner Objekte in Abhängigkeit Abstand und Phasendifferenz eines anregenden Pulspaars implementiert werden.

Zunächst sind solche Messungen an individuellen LH2 Komplexen von *Rps. acidophila* durchgeführt worden (Kapitel 4). Neben Abstand und Phasenbeziehung der Anregungspulse, sind zusätzlich in einem zweiten Experiment das grundlegende spektrale Profil der Laserpulse variiert und die Lock-Frequenz verändert worden. So konnten

Messergebnisse miteinander verglichen werden, bei denen beide Absorptionsbanden (B800 und B850) bzw. nur eine Absorptionsbande (B850) eine Anregung durch die Pulse erfährt. Zudem ist die Variation der Lock-Frequenz der erzeugten Doppelpulse für die Anregung der B850-Bande dargelegt.

Die Durchführung des Experiments an low-light LH2 Komplexen von *Rps. palustris* stellt wiederum einen Vergleich zu der Anregung beider Absorptionsbanden dar (Kapitel 5). Die beobachteten LH2 Komplexe der beiden Spezies weisen dabei eine gleiche Komposition aus BChl *a* auf, während sich die spektrale Absorption im Bereich der B850-Bande deutlich voneinander unterscheidet.

Die beobachteten Modulationen der Fluoreszenzsignale konnte auf die Interferenz von in den angeregten Zuständen erzeugten Exziton-Wellenpaketen zurückgeführt werden. Konstruktive bzw. destruktive Interferenz solcher Wellenpakete führen dazu, dass die Population der emittierenden Zustände mit dem Abstand der anregenden Pulse oszilliert. Für alle Variationen des Experiments an individuellen Komplexen zeigt sich eine heterogene Verteilung der Modulationsfrequenz, sowie der Dämpfung der Modulationen. Dies schließt auf die individuellen Mikroumgebungen der einzelnen Komplexe zurück, welche die Relaxationswege in den emittierenden Zustand verändern und somit auch die Interferenz der Wellenpakete beeinflussen.

Einen weiteren interessanten Aspekt lieferte die Beobachtung von variierenden Modulationen an ein und demselben Komplex über die Dauer mehrerer Messsequenzen hinweg. Durch die Interpretation der Modulationsfrequenz als Differenz zwischen Lock-Frequenz und spektraler Position der niedrigsten Exzitonzuständen konnte eine Verbindung zwischen den fluktuierenden Relaxationswege und den beteiligten Exzitonzuständen gefunden werden.

Letztendlich schaffen die Ergebnisse dieser Arbeit einen tieferen Einblick in die Dynamik der Relaxationsprozesse, die innerhalb der Exzitonzustände der B850 Band peripherer Lichtsammelkomplexe stattfinden. Aufbauend auf den Resultaten dieser Arbeit können weitere Messungen die Statistik der Fluoreszenzmodulationen und Dämpfungszeiten verbessern. Zudem bietet die zu Beginn angesprochene Vielfalt an beobachteten Absorptionsbanden der Lichtsammelkomplexe verschiedener Bakterienspezies und deren Wachstumsbedingungen einen wichtigen Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen unterschiedlicher Energielandschaften. Darüber hinaus können temperaturabhängige Messungen weitere Aufschlüsse über die Dynamik der Relaxationen liefern.

Anhang A

A.1 Kalibrierung des SLM

Um sicherzustellen, dass der Pulsformer den Erwartungen entsprechend arbeitet, muss der SLM richtig kalibriert werden. Dabei sind zwei Kalibrierungen von Bedeutung. Dies ist zum einen die richtige Beziehung zwischen LCD-Pixel und einfallender Wellenlänge des Pulses, zum anderen die anzulegende Spannung um eine bestimmte spektrale Amplituden- und Phasenänderung einer bestimmten Wellenlänge des Lichts zu bewirken.

Die Kalibrierung der anzulegenden Spannungen an den LCD Pixeln in Abhängigkeit von der Wellenlänge, um eine Änderung der jeweiligen spektralen Phase zu erzwingen, ist bereits extern von der Firma Hamamatsu, welche das LCD vertreibt, durchgeführt worden. Die Beziehung zwischen Wellenlänge, an den Pixeln anliegende Spannung und resultierende spektrale Amplituden- und Phasenänderung kann in den entsprechenden Dokumenten eingelesen werden [122].

Die Abstimmung der Pixel auf die einfallende Wellenlänge wird manuell bestimmt und überprüft. Das Konzept wird in Abbildung A.1A dargestellt. Mit Hilfe von spektralem Amplituden-Shaping kann die Transmission eines breitbandigen Pulsspektrums (grau) an einem bestimmten Pixel unterdrückt werden. Daraus resultiert ein Spektrum mit deutlich verringerter Intensität an der korrespondierenden Wellenlänge, im Vergleich zu dem unveränderten Spektrum. Abbildung A.1A zeigt ein Beispiel für ein an Pixelnummer 400 erzeugtes spektrales Loch (rot). Die gestrichelte Linie verdeutlicht, dass dieser Pixel mit einer Wellenlänge von 825,89 nm korrespondiert. Dies wird für verschiedene Pixel verteilt über das Pulsspektrum durchgeführt und ausgewertet (vgl. Abbildung A.1B). Die Software *MIIPS 2.0* errechnet daraus eine Kalibrationsgerade (blau). Diese

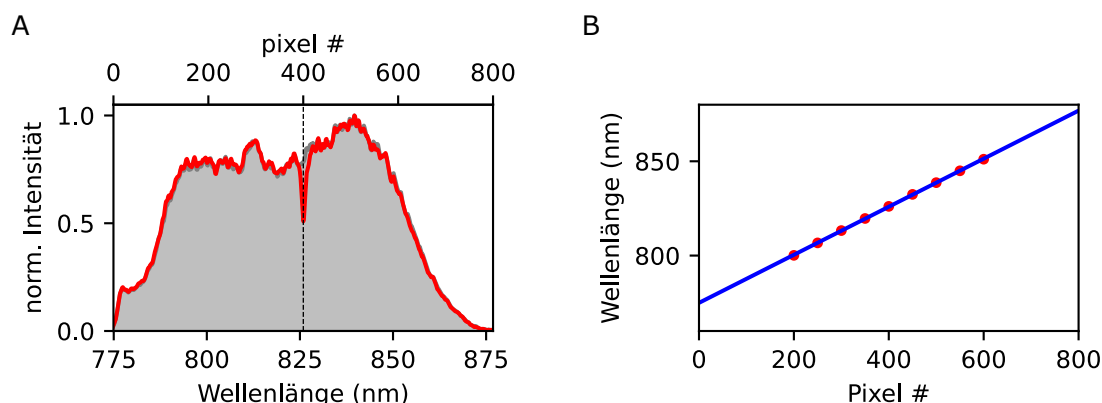


Abbildung A.1: Manuelle Kalibrierung der Beziehung zwischen LCD-Pixel und einfallender Wellenlänge. A) Experimentelles Pulsspektrum (grau), sowie gleiches Spektrum aus dem durch Amplitudenmanipulation eine spektrale Komponente unterdrückt wird (rot). B) Kalibrationsgerade (blau) der Wellenlänge in Abhängigkeit von der Pixelnummer. Die gemessenen Datenpunkte sind in rot dargestellt.

Kalibration muss bekannt sein, um die spektralen Amplituden- und Phasenmasken zur Erzeugung der phasen-gelockten Pulspaare richtig berechnen zu können.

A.2 Kalibration der Pixel-Position im Weitfeldbild

Zur Bestimmung der relativen Positionen einzelner Komplexe auf der Probe in einer Weitfeldaufnahme wurden die aus den CCD-Daten bekannten Pixelpositionen auf eine μm -Skala umgerechnet. Dafür war die Aufnahme des Weitfeldbildes eines Objektmikrometers notwendig, welche in Abbildung A.2A zu sehen ist. Bei dem Objektmikrometer handelt es sich um ein speziell beschichtetes Probenglas, wobei eine Einheitsskala auftreffendes Licht zurück reflektiert. Die Weitfeldaufnahme wird daher ohne dielektrische Lang- oder Kurzpassfilter in der Detektion durchgeführt, jedoch wird ein Graufilter zur Abschwächung der Lichtintensität vor der CCD-Kamera verwendet. Die Skalenteile des Objektmikrometers besitzen einen festen Abstand von $10\ \mu\text{m}$.

Das Objektmikrometer wird so ausgerichtet, dass die Skalen in einer vertikalen Linie zum CCD-Chip liegen (siehe Abbildung A.2A). So lassen sich die Abstände der Skalenteile in Richtung der horizontalen Achse ausmessen. Dazu wird das Intensitätsprofil einer Pixelreihe ausgelesen (Abbildung A.2B). Mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Python-Programms werden die Flanken der Intensitätsanstiege identifiziert und die Abstände zwischen zwei benachbarten aufsteigenden bzw. zwei abfallenden Flan-

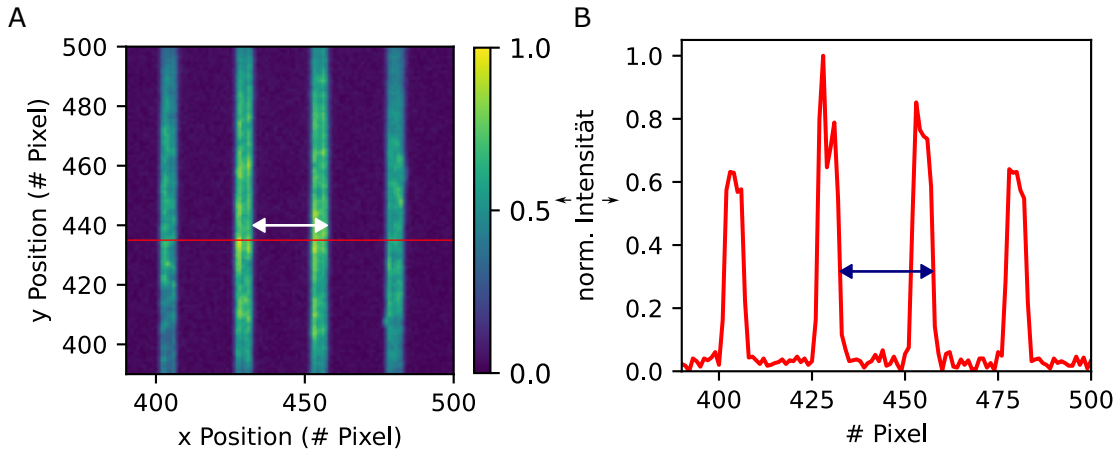


Abbildung A.2: Kalibrierung der Pixelpositionen in μm einer Weitfeldaufnahme. A) Ausschnitt der Weitfeldaufnahme einer Einheitsskala. B) Intensitätsprofil der in A) rot gekennzeichneten Pixelreihe. Der weiße bzw. blaue Doppelpfeil in A) bzw. B) kennzeichnet den Abstand der Einheitsskalenteile von $10\mu\text{m}$.

ken in Pixelzahlen bestimmt (vgl. weißer und blauer Doppelpfeil in Abbildung A.2). Dies wird für mehrere benachbarte Skalenteile durchgeführt. Für den optischen Aufbau dieser Arbeit erhält man so einen mittleren Skalenabstand von $\bar{d} = (24,4 \pm 0,5)$ Pixel. Mit dem bekannten Abstand von $10\mu\text{m}$ und der Festlegung, dass die Pixelposition $(0,0)$ der Position $(0,0)\mu\text{m}$ entsprechen soll, erhält man für die Beziehung zwischen Pixelposition und μm -Position:

$$\text{Position}[\mu\text{m}] \approx 0,41 \cdot \text{Position}[\text{Pixel}] \quad (\text{A.1})$$

Diese Berechnung ist Grundlage für die in Abbildung 4.1A aufgetragene μm Achsenbeschriftung.

A.3 Überlapp-Berechnung

Die Fluoreszenz der LH2-Komplexe in Abhängigkeit des zeitlichen Abstands der Anregungspulse kann in erster Näherung mit einer einfachen Berechnung des Überlapps der delay-abhängigen Pulsspektren mit der Absorption der Probe simuliert werden. Dies ist möglich, da dieser Überlapp im linearen Anregungsregime eines Absorptionsexperiments proportional zur Höhe des Fluoreszenzsignals ist.

Für die Simulation werden (ausgehend von einem experimentell ermittelten Pulsspek-

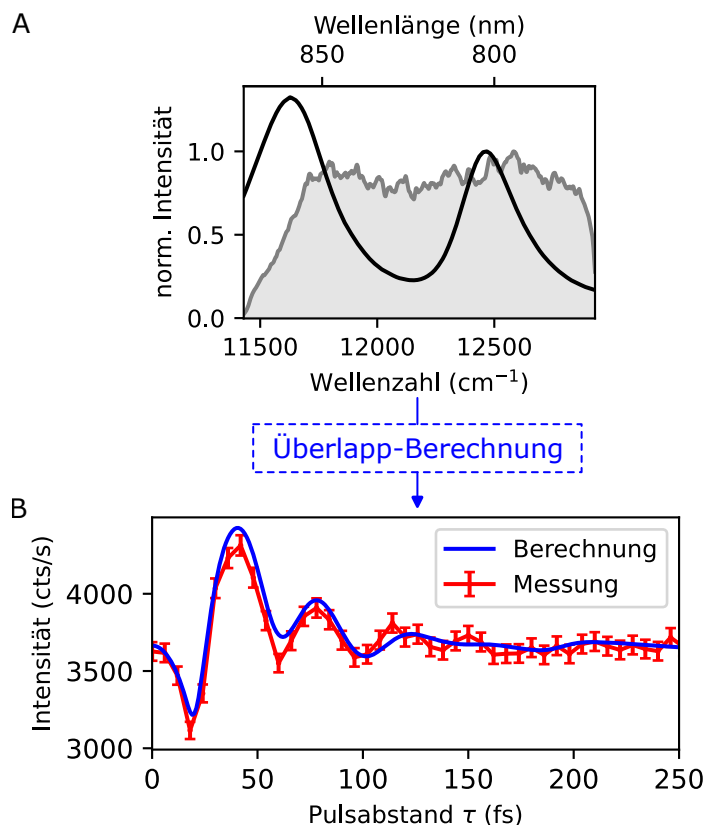


Abbildung A.3: Beispiel einer Überlapp-Berechnung. A) Für die Berechnung verwendetes Pulsspektrum (grau) und Absorptionsspektrum (schwarz) eines LH2-Ensembles der Spezies *Rps. acidophila*. B) Gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit des Pulsabstands τ eines LH2-Ensembles der Spezies *Rps. acidophila* (rot) und aus Überlapp berechnete Fluoreszenzantwort in Abhängigkeit von τ (blau).

trum) die Anregungspulsspektren $\text{Exc}(\omega, \tau)$ für jeden gewünschten Pulsabstand τ nach Gl.(3.2) berechnet und die resultierenden Spektren so normiert ($C(\tau)$), dass das Integral $\int_0^\infty \text{Exc}(\omega, \tau) d\omega$ über die Spektren für alle zeitlichen Pulsabstände gleich ist. Für die Absorption $\text{Abs}(\omega)$ der Probe (z.B. der LH2-Komplexe) wird ebenfalls ein experimentell ermitteltes Absorptionsspektrum verwendet. Die Fluoreszenz $F(\tau)$ lässt sich dann ausdrücken durch:

$$F(\tau) = \int_0^\infty \text{Exc}(\omega, \tau) \cdot \text{Abs}(\omega) d\omega \quad (\text{A.2})$$

Zur Veranschaulichung der Simulation ist in Abbildung A.3 eine solche Überlapp-Berechnung dargestellt. Mit den experimentellen Daten (Abbildung A.3A) für das Pulsspektrum (grau), gemessen mit einem USB-Spektrometer, und das Absorptionss-

pektrum eines Ensembles von LH2-Komplexen der Bakterienspezies *Rps. acidophila*, gemessen mit dem kommerziellen Absorptionsspektrometer *Lambda200* der Firma *PerkinElmer*, wird der Verlauf der Fluoreszenzantwort in Abhängigkeit des zeitlichen Pulsabstands τ simuliert. Die so berechnete Kurve (blau) ist in Abbildung A.3B zusammen mit einer realen Doppelpulsanregung an einer Ensemble Probe von LH2-Komplexen der selben Spezies (rot) aufgetragen. Beide Kurven weisen den gleichen Verlauf auf, die Überlapp-Berechnung bildet im Rahmen der Messunsicherheiten die gemessenen Daten gut ab. Mit Hilfe dieser Berechnung lässt sich somit ein die Abhängigkeit der Fluoreszenz von τ für eine Ensemble-Probe voraussagen.

A.4 Fouriertransformation einzelner Fluoreszenzmodulationen

Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand τ der anregenden Pulspaare erfolgt durch eine Fourieranalyse. Diese wird mit einem selbst geschriebenen Python-Programm über eine *Fast-Fourier-Transformation* realisiert. Abbildung A.4 stellt beispielhaft eine solche Fourieranalyse vor. Jede einzelne Sequenz einer solchen Messung (Abbildung A.4A) wird separat analysiert. Dadurch erhält man ein auf das Maximum normiertes Leistungsspektrum der im Signal vorhandenen Frequenzen (Abbildung A.4B). Das Maximum der Spektren markiert die in der Messsequenz (schwarz) bzw. der Mittelung (rot) auftretende Modulationsfrequenz.

Die separate Betrachtung der einzelnen Sequenzen erlaubt es, zeitliche Änderungen der dominierenden Frequenzkomponenten innerhalb einer vollständigen Messung gezielt zu erfassen. Gleichzeitig wird durch die Mittelung über mehrere Sequenzen ein robuster Wert für die Modulationsfrequenz gewonnen, der gegenüber statistischen Schwankungen der Einzelsequenzen weniger sensitiv ist.

Aus den Fourieranalysen der über fünf Messsequenzen gemittelten Fluoreszenzantwort (rote Kurven) erhält man die mittleren Modulationsfrequenzen, welche in die Histogrammen der Statistiken über die Messungen an LH2 Komplexen der Spezies *Rps. acidophila* (Anregung beider Banden Abbildung 4.3A, exklusive Anregung der B850 Bande 4.5C und D), sowie den Messungen an LL LH2 Komplexen der Spezies *Rps. palustris* (Abbildung 5.3A) einfließen. Da die Modulationsfrequenz der dominierenden Frequenzkomponente in dem oszillierenden Signal entspricht, wird diese Frequenz für die weitere Analyse der Dämpfungszeitkonstanten der Modulationen als fester Parameter

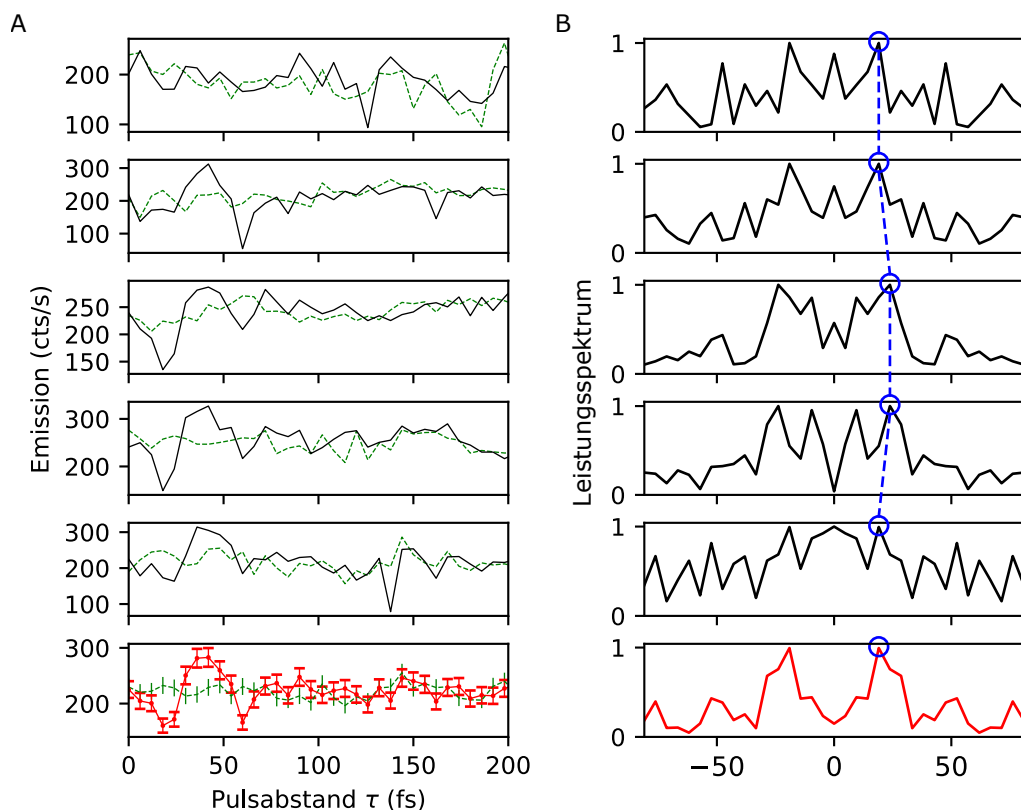


Abbildung A.4: Beispiel der Fourieranalyse eines individuellen Komplexes.

A) Fluoreszenzsignal eines LH2 Komplexes in Abhängigkeit des Pulsabstands τ der Anregungspulse. Die oberen fünf Graphen zeigen das Signal der einzelnen Messsequenzen in schwarz, im untersten Graphen ist der Mittelwert dieser Sequenzen in rot dargestellt. Das Referenzsignal ist in grün aufgezeichnet. B) Fourieranalyse der Fluoreszenzsignale der einzelnen Messsequenzen (schwarz) und der Mittelung (rot). Das Maximum der Ergebnisse aus den Fouriertransformationen ist durch einen blauen Kreis markiert, dazu ist der Verlauf eines solchen Maximums über fünf Sequenzen hinweg durch eine blaue gestrichelte Linie dargestellt.

des Kosinus-Fits verwendet, siehe auch Gl.(4.1).

Die dominanten Frequenzkomponenten der einzelnen Messsequenzen (schwarze Datenkurven) liefert die in Kapitel 6.2 aufgezeigten Variationen der Modulationsfrequenz über eine komplette Messung hinweg (Abbildungen 6.2 und 6.3). Dies ist auch an dem Beispiel in Abbildung A.4B durch die blau markierten Maxima und den Verlauf, gekennzeichnet durch die blau gestrichelte Linie dargestellt. In Messsequenz 1 (oben) startet die erhaltene Frequenz bei $f = 19,0$ THz, dies ist auch das Ergebnis in Messsequenz 2. Die Daten der dritten und vierten Sequenz liefern eine Modulationsfrequenz von $f = 23,8$ THz, bevor der Wert in Messsequenz 5 wieder auf $f = 19,0$ THz zurückspringt.

A.5 Zeitskalen der Energiefluktuationen

Die Beschreibung der Eigenenergien einzelner Chromophore erfolgt durch:

$$\hbar\omega_i = \hbar \left(\omega_0 + \overline{\delta\omega_i} + \delta\omega_i(t) \right), \quad (\text{A.3})$$

wobei ω_0 die ungestörte Energie des angeregten Zustands beschreibt, $\overline{\delta\omega_i}$ die statische Unordnung und $\delta\omega_i(t)$ die zeitlich dynamische Unordnung. Für die spektralen Phasen folgt daraus:

$$\phi(t) = -i \left(\Omega_L - \left[\omega_0 + \overline{\delta\omega_i} + \delta\omega_i(t) \right] \right) \cdot t \quad (\text{A.4})$$

$$\phi(t + \tau) = -i \left[\left(\Omega_L - \left[\omega_0 + \overline{\delta\omega_i} + \delta\omega_i(t + \tau) \right] \right) \cdot (t + \tau) + \Delta\varphi \right] \quad (\text{A.5})$$

Eine Interferenz zwischen den beiden, durch die Anregungspulse erzeugten, Wellenpakete findet nur dann statt, wenn die Korrelation $\sum_i \langle \delta\omega_i(0) \cdot \delta\omega_i(\tau) \rangle_t$ der Fluktuationen zu den Zeitpunkten des ersten und zweiten Pulses nicht verschwindet. Die Klammern $\langle \dots \rangle_t$ stellen dabei eine zeitliche Mittelung dar.

Für den zeitlichen Mittelwert der Energieschwankungen während der Dauer eines Anregungspulses τ_{pulse} erhält man:

$$\langle \delta\omega_i(t) \rangle_{\tau_{pulse}} = \frac{1}{\tau_{pulse}} \int_t^{t+\tau_{pulse}} \delta\omega_i(t') dt' \quad (\text{A.6})$$

Dieser Mittelwert ist für die zwei Pulse eines Pulspaares schematisch in Abbildung A.5A in rot aufgezeichnet. Die zeitliche Mittelung der Fluktuationen während der Anregung der LH2-Komplexe durch ein Pulspaar lässt sich wiederum beschreiben mit:

$$\overline{\delta\omega_i}(\tau, t) := \left\langle \delta\omega_i \left(t + \frac{\tau_{pulse}}{2} \right) \right\rangle_\tau = \frac{1}{\tau} \int_t^{t+\tau} \delta\omega_i \left(t' + \frac{\tau_{pulse}}{2} \right) dt' \quad (\text{A.7})$$

und ist in Abbildung A.5A durch eine gestrichelt blaue Linie dargestellt. Daraus folgt, dass die Fluktuationen der Energien $\delta\omega_i \left(t + \frac{\tau_{pulse}}{2} \right)$ nicht zu groß werden dürfen, andernfalls findet keine Interferenz zwischen den erzeugten Wellenpaketen statt. Für die Korrelation der Fluktuationen auf sehr kurzer Zeitskala gilt entsprechend:

$$\sum_i \langle \delta\omega_i(0) \cdot \delta\omega_i(t) \rangle_t \quad \text{für } 0 \leq t \leq \tau \quad (\text{A.8})$$

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wird die Probe für die Dauer einer spektralen Amplituden- und Phasenmaske des Pulsformers mit Pulspaares angeregt, welche den selben Pulsab-

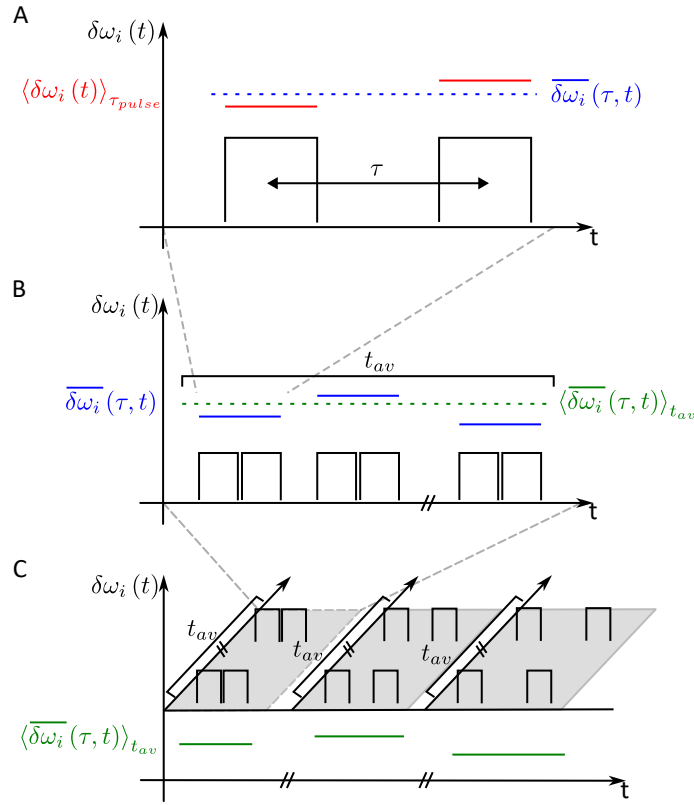


Abbildung A.5: Schematische Illustration der Mittelungen und verschiedenen Zeitskalen. A) Energiefluktuationen und zeitliche Mittelwerte während eines Pulses (rot) und über ein Pulspaar (blau). B) Zeitliche Mittelungen der Energiefluktuationen über ein Pulspaar (blau) und mehrere aufeinanderfolgende Pulspaare (grün). C) Zeitlich gemittelte Energiefluktuationen (grün) für mehrere Messblöcke mit steigendem Pulsabstand τ . Die Zeitskalen in den einzelnen Schemas steigt von 10-250fs (A) zu 1 s (B) bis hin zu mehreren 10 s (C).

stand τ besitzen. Dadurch wird das Signal in Abhängigkeit von dem zeitlichen Abstand der Pulse über genau diese Maskendauer t_{av} gemittelt und somit auch die Fluktuationen der Energiezustände:

$$\langle\overline{\delta\omega_i}(\tau, t)\rangle_{t_{av}} = \frac{1}{t_{av}} \int_t^{t+t_{av}} \overline{\delta\omega_i}(\tau, t') dt' \quad (\text{A.9})$$

Dies ist auch in Abbildung A.5B schematisch dargestellt. Die gemittelten Energiefluktuationen $\overline{\delta\omega_i}(\tau, t)$ in blau werden über den Dauer der Messung bei einem festen Pulsabstand τ erneut gemittelt (grüne, gestrichelte Linie). Die Effekte der Interferenz zwischen den Wellenpaketen lassen sich nur dann beobachten, wenn sich die zeitlichen Mittel der Fluktuationen $\overline{\delta\omega_i}(\tau, t)$ während der Anregungen durch die einzelnen Pulspaare zu sehr voneinander unterscheiden, bzw. wenn die zeitlichen Fluktuationen klein

1,4K sind die spektralen Positionen der niedrigsten Exzitonszustände des B850-Rings ermittelt worden.

Die Verteilung der gemessenen spektralen Positionen ist in Abbildung A.6A dargestellt. Aus den Mittelwerten und den Standardabweichungen dieser Daten bestimmen sich die in den Abbildungen 6.2 und 4.6 markierten Positionen und Breiten der Kästen zur Veranschaulichung der niedrigsten Exzitonzustände. In Abbildung A.6B ist zu erkennen, dass die ermittelten Exzitonpositionen für verschiedene individuelle Komplexe unabhängig voneinander variieren.

In einer weiteren Forschungsarbeit sind die spektralen Positionen der B850 Zustände basierend auf einem theoretischen Modell bestimmt worden [93]. Dieses Modell berücksichtigt auch zusätzlich auftretende Charge-Transfer-Zustände. Vergleicht man die Energiedifferenzen zwischen den Exzitonpositionen der theoretischen Studie mit den experimentellen Daten, so lässt sich feststellen, dass der qualitative Trend dieser Differenzen durch das theoretische Modell reproduziert werden kann.

Die Positionen der niedrigsten Exzitonzustände im B850 Ringe der LL LH2 Komplexe von *Rps. palustris* sind aus der Einzelmolekülstudie bei tiefen Temperaturen (1,4K) von Brotsudarmo et. al [12] abgeschätzt worden. Die hierfür verwendeten Daten sind in Abbildung A.7 dargestellt. Hier konnten vier Absorptionsbanden beobachtet werden. Durch die Statistik der Energiedifferenzen zwischen den energiereicheren Banden

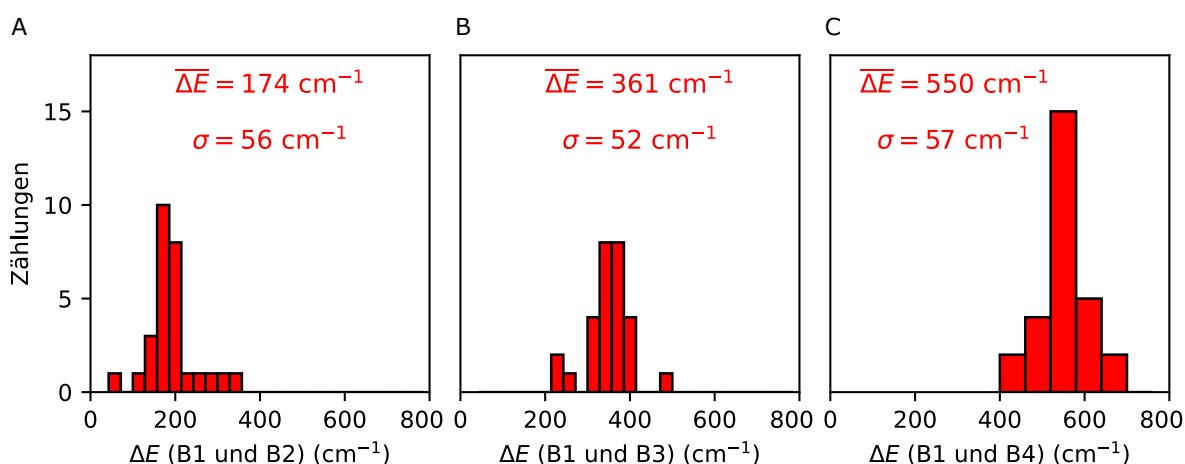


Abbildung A.7: Spektrale Abstände beobachteter Absorptionsbanden individueller LL LH2 Komplexe der Spezies *Rps. palustris*. Verteilung der Energiedifferenzen ΔE zwischen den Absorptionsbanden A) B1 und B2, B) B1 und B3, C) B1 und B4. Der Mittelwert $\overline{\Delta E}$, sowie die Standardabweichung σ der Verteilungen sind neben den jeweiligen Histogrammen angegeben. Daten entnommen aus [12].

zur energieärmsten Bande bei $11\,562\text{ cm}^{-1}$, sind aus den Mittelwerten die spektralen Positionen und aus den Standardabweichungen die spektrale Breite der niedrigsten Exzitonzustände bestimmt worden (vgl. Abbildung 6.3B).

Literatur

- [1] *Molecular mechanisms of photosynthesis*, 1. publ, (Hrsg.: R. E. Blankenship), Blackwell Science, London und Berlin, **2002**.
- [2] R. J. Cogdell, J. Köhler in *Quantum Efficiency in Complex Systems, Part I: Biomolecular systems*, Semiconductors and Semimetals, Elsevier, **2010**, S. 77–94.
- [3] T. Mirkovic, E. E. Ostroumov, J. M. Anna, R. van Grondelle, Govindjee, G. D. Scholes, “Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms”, *Chemical reviews* **2017**, *117*, 249–293.
- [4] R. J. Cogdell, A. Gall, J. Köhler, “The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes”, *Quarterly reviews of biophysics* **2006**, *39*, 227–324.
- [5] N. Pfennig, “Photosynthetic Bacteria”, *Annu. Rev. Microbiol. (Annual Review of Microbiology)* **1967**, *21*, 285–324.
- [6] W. Zinth, J. Wachtveitl, “The first picoseconds in bacterial photosynthesis—ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy”, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2005**, *6*, 871–880.
- [7] S. Hess, M. Chachisvilis, K. Timpmann, M. R. Jones, G. J. Fowler, C. N. Hunter, V. Sundström, “Temporally and spectrally resolved subpicosecond energy transfer within the peripheral antenna complex (LH2) and from LH2 to the core antenna complex in photosynthetic purple bacteria”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 12333–12337.
- [8] L. M. P. Beekman, F. van Mourik, M. R. Jones, H. M. Visser, C. N. Hunter, R. van Grondelle, “Trapping Kinetics in Mutants of the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*: Influence of the Charge Separation Rate

- and Consequences for the Rate-Limiting Step in the Light-Harvesting Process”, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3143–3147.
- [9] A. Freiberg, J. P. Allen, J. C. Williams, N. W. Woodbury, “Energy trapping and detrapping by wild type and mutant reaction centers of purple non-sulfur bacteria”, *Photosynthesis research* **1996**, *48*, 309–319.
- [10] K. McLuskey, S. M. Prince, R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, “The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050”, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8783–8789.
- [11] S. Kereïche, L. Bourinet, W. Keegstra, A. A. Arteni, J.-M. Verbavatz, E. J. Boekema, B. Robert, A. Gall, “The peripheral light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria have different ‘ring’ sizes”, *FEBS letters* **2008**, *582*, 3650–3656.
- [12] T. H. P. Brotosudarmo, R. Kunz, P. Böhm, A. T. Gardiner, V. Moulisová, R. J. Cogdell, J. Köhler, “Single-molecule spectroscopy reveals that individual low-light LH2 complexes from *Rhodospseudomonas palustris* 2.1.6. have a heterogeneous polypeptide composition”, *Biophysical journal* **2009**, *97*, 1491–1500.
- [13] A. Löhner, A.-M. Carey, K. Hacking, N. Picken, S. Kelly, R. Cogdell, J. Köhler, “The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochromatium vinosum*”, *Photosynthesis research* **2015**, *123*, 23–31.
- [14] P. Qian, D. J. K. Swainsbury, T. I. Croll, P. Castro-Hartmann, G. Divitini, K. Sader, C. N. Hunter, “Cryo-EM Structure of the *Rhodobacter sphaeroides* Light-Harvesting 2 Complex at 2.1 Å”, *Biochemistry* **2021**, *60*, 3302–3314.
- [15] J. Koepke, X. Hu, C. Muenke, K. Schulten, H. Michel, “The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum rubrum*”, *Structure* **1996**, *4*, 581–597.
- [16] P. Cao, L. Bracun, A. Yamagata, B. M. Christianson, T. Negami, B. Zou, T. Terada, D. P. Canniffe, M. Shirouzu, M. Li, L.-N. Liu, “Structural basis for the assembly and quinone transport mechanisms of the dimeric photosynthetic RC-LH1 supercomplex”, *Nature communications* **2022**, *13*, 1977.
- [17] A. T. Gardiner, K. Naydenova, P. Castro-Hartmann, T. C. Nguyen-Phan, C. J. Russo, K. Sader, C. N. Hunter, R. J. Cogdell, P. Qian, “The 2.4 Å cryo-EM structure of a heptameric light-harvesting 2 complex reveals two carotenoid energy transfer pathways”, *Science Advances* **2021**, *7*, 1–7.

-
- [18] R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, A. A. Freer, T. D. Howard, A. T. Gardiner, S. M. Prince, M. Z. Papiz, “The structural basis of light-harvesting in purple bacteria”, *FEBS letters* **2003**, *555*, 35–39.
- [19] R. Kunz, *Spectroscopic Investigations of Light-Harvesting 2 Complexes from Rps. acidophila: Fluorescence-Excitation and Emission Spectroscopy on Ensembles and Individual Complexes: Dissertation*, Universität Bayreuth, **2013**.
- [20] G. McDermott, S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. Hawthornthwaite-Lawless, Papiz M. Z., R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, “Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria”, *Nature* **1995**, *374*, 517–521.
- [21] M. Z. Papiz, S. M. Prince, T. Howard, R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, “The structure and thermal motion of the B800-850 LH2 complex from Rps.acidophila at 2.0Å resolution and 100K: new structural features and functionally relevant motions”, *Journal of molecular biology* **2003**, *326*, 1523–1538.
- [22] M. H. Tadros, K. Waterkamp, “Multiple copies of the coding regions for the lightharvesting B800-850 α - and β -polypeptides are present in the Rhodopseudomonas palustris genome”, *The EMBO Journal* **1989**, *8*, 1303–1308.
- [23] M. H. Tadros, E. Katsiou, M. A. Hoon, N. Yurkova, D. P. Ramji, “Cloning of a new antenna gene cluster and expression analysis of the antenna gene family of Rhodopseudomonas palustris”, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 867–875.
- [24] A. Ishizaki, G. R. Fleming, “Quantum Coherence in Photosynthetic Light Harvesting”, *Annual Review of Condensed Matter Physics* **2012**, *3*, 333–361.
- [25] G. D. Scholes, “Quantum-Coherent Electronic Energy Transfer: Did Nature Think of It First?”, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, *1*, 2–8.
- [26] G. D. Scholes, G. R. Fleming, L. X. Chen, A. Aspuru-Guzik, A. Buchleitner, D. F. Coker, G. S. Engel, R. van Grondelle, A. Ishizaki, D. M. Jonas, J. S. Lundeen, J. K. McCusker, S. Mukamel, J. P. Ogilvie, A. Olaya-Castro, M. A. Ratner, F. C. Spano, K. B. Whaley, X. Zhu, “Using coherence to enhance function in chemical and biophysical systems”, *Nature* **2017**, *543*, 647–656.
- [27] G. R. Fleming, G. D. Scholes, “The development and applications of multidimensional biomolecular spectroscopy illustrated by photosynthetic light harvesting”, *Quarterly reviews of biophysics* **2024**, *57*, e11.

- [28] E. C. Wu, E. A. Arsenault, P. Bhattacharyya, N. H. C. Lewis, G. R. Fleming, “Two-dimensional electronic vibrational spectroscopy and ultrafast excitonic and vibronic photosynthetic energy transfer”, *Faraday discussions* **2019**, *216*, 116–132.
- [29] J. Dostál, J. Pšenčík, D. Zigmantas, “In situ mapping of the energy flow through the entire photosynthetic apparatus”, *Nature chemistry* **2016**, *8*, 705–710.
- [30] O. C. Fiebig, D. Harris, D. Wang, M. P. Hoffmann, G. S. Schlau-Cohen, “Ultrafast Dynamics of Photosynthetic Light Harvesting: Strategies for Acclimation Across Organisms”, *Annual review of physical chemistry* **2023**, *74*, 493–520.
- [31] J. Cao, R. J. Cogdell, D. F. Coker, H.-G. Duan, J. Hauer, U. Kleinekathöfer, T. L. C. Jansen, T. Mancal, R. J. D. Miller, J. P. Ogilvie, V. I. Prokhorenko, T. Renger, H.-S. Tan, R. Tempelaar, M. Thorwart, E. Thyryhaug, S. Westenhoff, D. Zigmantas, “Quantum biology revisited”, *Science Advances* **2020**, *6*, 1–11.
- [32] H. Sumi, “Bacterial Photosynthesis Begins with Quantum-Mechanical Coherence”, *The Chemical Record* **2001**, *1*, 480–493.
- [33] S. Jang, M. D. Newton, R. J. Silbey, “Multichromophoric Förster resonance energy transfer from b800 to b850 in the light harvesting complex 2: evidence for subtle energetic optimization by purple bacteria”, *The journal of physical chemistry. B* **2007**, *111*, 6807–6814.
- [34] A. Chenu, G. D. Scholes, “Coherence in energy transfer and photosynthesis”, *Annual review of physical chemistry* **2015**, *66*, 69–96.
- [35] G. R. Fleming, G. S. Schlau-Cohen, K. Amarnath, J. Zaks, “Design principles of photosynthetic light-harvesting”, *Faraday discussions* **2012**, *155*, 27–41; discussion 103–14.
- [36] L. Wang, M. Allodi, G. Engel, “Quantum coherences reveal excited-state dynamics in biophysical systems”, *Nature Reviews Chemistry* **2019**, *3*, 477–490.
- [37] D. Zigmantas, T. Polívka, P. Persson, V. Sundström, “Ultrafast laser spectroscopy uncovers mechanisms of light energy conversion in photosynthesis and sustainable energy materials”, *Chemical Physics Reviews* **2022**, *3*, DOI [10.1063/5.0092864](https://doi.org/10.1063/5.0092864).
- [38] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser, “The dynamics of structural deformations of immobilized single light-harvesting complexes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 11271–11276.

-
- [39] C. Tietz, F. Jelezko, U. Gerken, S. Schuler, A. Schubert, H. Rogl, J. Wrachtrup, “Single Molecule Spectroscopy on the Light-Harvesting Complex II of Higher Plants”, *Biophysical journal* **2001**, *81*, 556–562.
- [40] C. Hofmann, T. J. Aartsma, H. Michel, J. Köhler, “Direct observation of tiers in the energy landscape of a chromoprotein: A single-molecule study”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 15534–15538.
- [41] C. Hofmann, T. J. Aartsma, H. Michel, J. Köhler, “Spectral dynamics in the B800 band of LH2 from Rhodospirillum rubrum: a single-molecule study”, *New Journal of Physics* **2004**, *6*.
- [42] J. Baier, M. F. Richter, R. J. Cogdell, S. Oellerich, J. Köhler, “Determination of the spectral diffusion kernel of a protein by single-molecule spectroscopy”, *Physical review letters* **2008**, *100*, 018108.
- [43] G. S. Schlau-Cohen, H.-Y. Yang, T. P. J. Krüger, P. Xu, M. Gwizdala, R. van Grondelle, R. Croce, W. E. Moerner, “Single-Molecule Identification of Quenched and Unquenched States of LHCII”, *The journal of physical chemistry letters* **2015**, *6*, 860–867.
- [44] T. P. J. Krüger, E. Wientjes, R. Croce, R. van Grondelle, “Conformational switching explains the intrinsic multifunctionality of plant light-harvesting complexes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 13516–13521.
- [45] P. Malý, J. M. Gruber, R. J. Cogdell, T. Mančal, R. van Grondelle, “Ultrafast energy relaxation in single light-harvesting complexes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113*, 2934–2939.
- [46] R. Moya, A. C. Norris, T. Kondo, G. S. Schlau-Cohen, “Observation of robust energy transfer in the photosynthetic protein allophycocyanin using single-molecule pump-probe spectroscopy”, *Nature chemistry* **2022**, *14*, 153–159.
- [47] R. Hildner, D. Brinks, J. B. Nieder, R. J. Cogdell, N. F. van Hulst, “Quantum coherent energy transfer over varying pathways in single light-harvesting complexes”, *Science (New York, N.Y.)* **2013**, *340*, 1448–1451.
- [48] W. Demtröder, *Molekülphysik: Theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*, Zweiten überarbeitete und erweiterte Auflage, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, Germany, **2013**.

- [49] M. Kasha, “Characterization of electronic transitions in complex molecules”, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.
- [50] S. Tretiak, C. Middleton, V. Chernyak, S. Mukamel, “Exciton Hamiltonian for the Bacteriochlorophyll System in the LH2 Antenna Complex of Purple Bacteria”, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 4519–4528.
- [51] A. Köhler, H. Bässler, *Electronic processes in organic semiconductors: An introduction*, Wiley-VCH, Weinheim, **2015**.
- [52] S. C. Rand, *Lectures on Light: Nonlinear and Quantum Optics Using the Density Matrix*, 2. Aufl., Oxford University Press, **2016**.
- [53] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, “Ten Years of Single-Molecule Spectroscopy”, *The journal of physical chemistry. A* **2000**, *104*, 1–16.
- [54] R. Jankowiak, M. Reppert, V. Zazubovich, J. Pieper, T. Reinot, “Site selective and single complex laser-based spectroscopies: a window on excited state electronic structure, excitation energy transfer, and electron-phonon coupling of selected photosynthetic complexes”, *Chemical reviews* **2011**, *111*, 4546–4598.
- [55] M. Toutounji, G. J. Small, S. Mukamel, “Optical response functions for condensed systems with linear and quadratic electron–vibration coupling”, *The Journal of Chemical Physics* **1998**, *109*, 7949–7960.
- [56] T. Basché, S. Kummer, C. Bräuchle in *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*.
- [57] M. Orrit, J. Bernard, R. I. Personov, “High-Resolution Spectroscopy of Organic Molecules in Solids: From Fluorescence Line Narrowing and Hole Burning to Single Molecule Spectroscopy”, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *97*, 10256–10268.
- [58] C. Hofmann, *Pigment-Pigment Interactions and Protein Dynamics in Light-Harvesting Complexes: a Single-Molecule Study: Dissertation*, **2004**.
- [59] W. W. Parson, *Modern Optical Spectroscopy*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [60] H. van Amerongen, L. Valkunas, R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons*, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, **2000**.
- [61] T. Förster, “Energiewanderung und Fluoreszenz”, *Die Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175.

-
- [62] T. Förster, “Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz”, *Annalen der Physik* **1948**, 437, 55–75.
- [63] G. D. Scholes, “Long-Range Resonance Energy Transfer in Molecular Systems”, **2003**, 54, 57–87.
- [64] G. A. Jones, D. S. Bradshaw, “Resonance Energy Transfer: From Fundamental Theory to Recent Applications”, *Front. Phys.* **2019**, 7, 1–19.
- [65] R. van Grondelle, V. I. Novoderezhkin, “Energy transfer in photosynthesis: experimental insights and quantitative models”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8.
- [66] J. Baier, M. Gabrielsen, S. Oellerich, H. Michel, M. van Heel, R. J. Cogdell, J. Köhler, “Spectral diffusion and electron-phonon coupling of the B800 BChl a molecules in LH2 complexes from three different species of purple bacteria”, *Biophysical journal* **2009**, 97, 2604–2612.
- [67] *Theory of Molecular Excitons*, (Hrsg.: A. S. Davydov), Springer US, Boston, MA und s.l., **1971**.
- [68] J. Knoester in *Organic nanostructures: Science and Applications*, S. 149–186.
- [69] H.-M. Wu, M. Ratsep, I.-J. Lee, R. J. Cogdell, G. J. Small, “Exciton Level Structure and Energy Disorder of the B850 Ring of the LH2 Antenna Complex”, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, 101, 7654–7663.
- [70] H.-M. Wu, G. J. Small, “Symmetry-Based Analysis of the Effects of Random Energy Disorder on the Excitonic Level Structure of Cyclic Arrays: Application to Photosynthetic Antenna Complexes”, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 888–898.
- [71] M. Matsushita, M. Ketelaars, A. M. van Oijen, J. Köhler, T. J. Aartsma, J. Schmidt, “Spectroscopy on the B850 Band of Individual Light-Harvesting 2 Complexes of *Rhodospseudomonas acidophila* II. Exciton States of an Elliptically Deformed Ring Aggregate”, *Biophysical journal* **2001**, 90, 1604–1614.
- [72] R. G. Alden, E. Johnson, V. Nagarajan, W. W. Parson, C. J. Law, R. J. Cogdell, “Calculations of Spectroscopic Properties of the LH2 Bacteriochlorophyll-Protein Antenna Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*”, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, 101, 4667–4680.
- [73] X. Hu, T. Ritz, A. Damjanovic, K. Schulten, “Pigment Organization and Transfer of Electronic Excitation in the Photosynthetic Unit of Purple Bacteria”, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3854–3871.

- [74] M. V. Mostovoy, J. Knoester, “Statistics of Optical Spectra from Single-Ring Aggregates and Its Application to LH2”, *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 12355–12364.
- [75] K. Sauer, R. J. Cogdell, S. M. Prince, A. Freer, N. W. Isaacs, H. Scheer, “Structure-Based Calculations of the Optical Spectra of the LH2 Bacteriochlorophyll-Protein Complex from *Rhodospseudomonas acidophila*”, *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *64*, 564–576.
- [76] R. J. Cogdell, A. M. Hawthornthwaite in *Photosynthetic Reaction Center*, Elsevier, **1993**, S. 23–42.
- [77] K. Wilma, C.-C. Shu, U. Scherf, R. Hildner, “Two-photon induced ultrafast coherence decay of highly excited states in single molecules”, *New Journal of Physics* **2019**, *21*, 045001.
- [78] V. V. Lozovoy, I. Pastirk, M. Dantus, “Multiphoton intrapulse interference. IV. Ultrashort laser pulse spectral phase characterization and compensation”, *Optics letters* **2004**, *29*, 775–777.
- [79] B. Xu, J. M. Gunn, J. M. D. Cruz, V. V. Lozovoy, M. Dantus, “Quantitative investigation of the multiphoton intrapulse interference phase scan method for simultaneous phase measurement and compensation of femtosecond laser pulses”, *Journal of the Optical Society of America B* **2006**, *23*, 750.
- [80] K. Wilma, *Ultrafast Coherent Dynamics of Electronic Excitations in Single Conjugated Polymers and Supramolecular Aggregates: Dissertation*, **2019**.
- [81] J. M. Dawlaty, A. Ishizaki, A. K. De, G. R. Fleming, “Microscopic quantum coherence in a photosynthetic-light-harvesting antenna”, *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **2012**, *370*, 3672–3691.
- [82] N. F. Scherer, R. J. Carlson, A. Matro, M. Du, A. J. Ruggiero, V. Romero-Rochin, J. A. Cina, G. R. Fleming, S. A. Rice, “Fluorescence-detected wave packet interferometry: Time resolved molecular spectroscopy with sequences of femtosecond phase-locked pulses”, *The Journal of Chemical Physics* **1991**, *95*, 1487–1511.
- [83] E. Gellings, R. J. Cogdell, N. F. van Hulst, “Room-Temperature Excitation-Emission Spectra of Single LH2 Complexes Show Remarkably Little Variation”, *The journal of physical chemistry letters* **2020**, *11*, 2430–2435.

-
- [84] A. M. Weiner, J. P. Heritage, E. M. Kirschner, “High-resolution femtosecond pulse shaping”, *J. Opt. Soc. Am. B* **1988**, 5.
- [85] A. M. Weiner, “Femtosecond pulse shaping using spatial light modulators”, *Review of Scientific Instruments* **2000**.
- [86] A. M. Weiner, “Ultrafast optical pulse shaping: A tutorial review”, *Optics Communications* **2011**, 284, 3669–3692.
- [87] T. Z. Minikhanov, E. Y. Zlokazov, R. S. Starikov, P. A. Cheremkhin, “Phase modulation time dynamics of the liquid-crystal spatial light modulator”, *Measurement Techniques* **2024**, 66, 935–939.
- [88] D. Xu, H. Chen, S.-T. Wu, M.-C. Li, S.-L. Lee, W.-C. Tsai, “A Fringe Field Switching Liquid Crystal Display With Fast Grayscale Response Time”, *Journal of Display Technology* **2015**, 11, 353–359.
- [89] J. Zou, Q. Yang, E.-L. Hsiang, H. Ooishi, Z. Yang, K. Yoshidaya, S.-T. Wu, “Fast-Response Liquid Crystal for Spatial Light Modulator and LiDAR Applications”, *Crystals* **2021**, 11, 1–10.
- [90] S. Wiesneth, P. Recknagel, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, R. Hildner, J. Köhler, “Fluorescence-Detected Wavepacket Interferometry Reveals Time-Varying Exciton Relaxation Pathways in Single Light-Harvesting Complexes”, *Journal of the American Chemical Society* **2025**, 147, 40537–40546.
- [91] R. K. Clayton, B. J. Clayton, “B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: Extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, 78, 5583–5587.
- [92] T. J. Pflöck, S. Oellerich, L. Krapf, J. Southall, R. J. Cogdell, G. M. Ullmann, J. Köhler, “The electronically excited states of LH2 complexes from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050 studied by time-resolved spectroscopy and dynamic Monte Carlo simulations. II. Homo-arrays of LH2 complexes reconstituted into phospholipid model membranes”, *The journal of physical chemistry. B* **2011**, 115, 8821–8831.
- [93] L. Cupellini, S. Caprasecca, C. A. Guido, F. Müh, T. Renger, B. Mennucci, “Coupling to Charge Transfer States is the Key to Modulate the Optical Bands for Efficient Light Harvesting in Purple Bacteria”, *The journal of physical chemistry letters* **2018**, 9, 6892–6899.

- [94] C. Leichtle, W. P. Schleich, I. S. Averbukh, M. Shapiro, “Wave packet interferometry without phase-locking”, *Journal of Chemical Physics* **1998**, *108*, 6057–6067.
- [95] J. Kim, T. C. Nguyen-Phan, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, G. D. Scholes, M. Cho, “Low-Frequency Vibronic Mixing Modulates the Excitation Energy Flow in Bacterial Light-Harvesting Complex II”, *The journal of physical chemistry letters* **2021**, *12*, 6292–6298.
- [96] E. Thyrgaugh, M. Schröter, E. Bukartè, O. Kühn, R. Cogdell, J. Hauer, D. Zigmantas, “Intraband dynamics and exciton trapping in the LH2 complex of *Rhodospseudomonas acidophila*”, *The Journal of Chemical Physics* **2021**, *154*, 045102.
- [97] R. Monshouwer, I. O. de Zarate, F. van Mourik, R. van Grondelle, “Low-intensity pump-probe spectroscopy on the B800 to B850 transfer in the light harvesting 2 complex of *Rhodobacter sphaeroides*”, *Chemical Physics Letters* **1995**, *246*, 341–346.
- [98] H.-M. Wu, S. Savikhin, N. R. S. Reddy, R. Jankowiak, R. J. Cogdell, W. S. Struve, G. J. Small, “Femtosecond and Hole-Burning Studies of B800’s Excitation Energy Relaxation Dynamics in the LH2 Antenna Complex of *Rhodospseudomonas acidophila* (Strain 10050)”, *J. Phys. Chem* **1996**, *100*, 12022–12033.
- [99] T. Pullertis, S. Hess, J. L. Herek, V. Sundström, “Temperature Dependence of Excitation Transfer in LH2 of *Rhodobacter sphaeroides*”, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10569 –10567.
- [100] C. de Caro, R. W. Visschers, R. van Grondelle, S. Völker, “Inter- and Intraband Energy Transfer in LH2-Antenna Complexes of Purple Bacteria. A Fluorescence Line-Narrowing and Hole-Burning Study”, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 10582–10590.
- [101] A. Ishizaki, T. R. Calhoun, G. S. Schlau-Cohen, G. R. Fleming, “Quantum coherence and its interplay with protein environments in photosynthetic electronic energy transfer”, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2010**, *12*, 7319–7337.
- [102] D. S. Hoffmann, P. M. Dohmen, M. Sokolov, U. Kleinekathöfer, M. Elstner, “Exciton Transfer Simulations in a Light-Harvesting 2 Complex Reveal the Transient Delocalization Mechanism”, *The journal of physical chemistry. B* **2025**, *129*, 3345–3365.

-
- [103] A. Freiberg, M. Rätsep, K. Timpmann, G. Trinkunas, “Excitonic polarons in quasi-one-dimensional LH1 and LH2 bacteriochlorophyll a antenna aggregates from photosynthetic bacteria: A wavelength-dependent selective spectroscopy study”, *Chemical Physics* **2009**, *357*, 102–112.
- [104] A. Freiberg, G. Trinkunas in *Laisk, Nedbal et al. (Hg.) 2009 – Photosynthesis in silico*, S. 55–82.
- [105] R. Kunz, K. Timpmann, J. Southall, R. J. Cogdell, A. Freiberg, J. Köhler, “Exciton self trapping in photosynthetic pigment-protein complexes studied by single-molecule spectroscopy”, *The journal of physical chemistry. B* **2012**, *116*, 11017–11023.
- [106] R. Kunz, K. Timpmann, J. Southall, R. J. Cogdell, A. Freiberg, J. Köhler, “Fluctuations in the electron-phonon coupling of a single chromoprotein”, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, *52*, 8726–8730.
- [107] R. Kunz, K. Timpmann, J. Southall, R. J. Cogdell, J. Köhler, A. Freiberg, “Fluorescence-excitation and emission spectra from LH2 antenna complexes of *Rhodospseudomonas acidophila* as a function of the sample preparation conditions”, *The journal of physical chemistry. B* **2013**, *117*, 12020–12029.
- [108] G. S. Schlau-Cohen, Q. Wang, J. Southall, R. J. Cogdell, W. E. Moerner, “Single-molecule spectroscopy reveals photosynthetic LH2 complexes switch between emissive states”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 10899–10903.
- [109] T. L. C. Jansen, L. M. Günther, J. Knoester, J. Köhler, “Electronically excited states in cylindrical molecular aggregates: Exciton delocalization, dynamics, and optical response”, *Chemical Physics Reviews* **2024**, *5*, DOI [10.1063/5.0225327](https://doi.org/10.1063/5.0225327).
- [110] J. Kim, T. C. Nguyen-Phan, A. T. Gardiner, T. H. Yoon, R. J. Cogdell, M. Cho, G. D. Scholes, “Vibrational Modes Promoting Exciton Relaxation in the B850 Band of LH2”, *The journal of physical chemistry letters* **2022**, *13*, 1099–1106.
- [111] A. Mattioni, F. Caycedo-Soler, S. F. Huelga, M. B. Plenio, “Design Principles for Long-Range Energy Transfer at Room Temperature”, *Physical Review X* **2021**, *11*, DOI [10.1103/PhysRevX.11.041003](https://doi.org/10.1103/PhysRevX.11.041003).
- [112] E. Romero, R. Augulis, V. I. Novoderezhkin, M. Ferretti, J. Thieme, D. Zigmantas, R. van Grondelle, “Quantum Coherence in Photosynthesis for Efficient Solar Energy Conversion”, *Nature physics* **2014**, *10*, 676–682.

- [113] J. C. Dean, T. Mirkovic, Z. S. Toa, D. G. Oblinsky, G. D. Scholes, “Vibronic Enhancement of Algae Light Harvesting”, *Chem* **2016**, *1*, 858–872.
- [114] M. Maiuri, E. E. Ostroumov, R. G. Saer, R. E. Blankenship, G. D. Scholes, “Coherent wavepackets in the Fenna-Matthews-Olson complex are robust to excitonic-structure perturbations caused by mutagenesis”, *Nature chemistry* **2018**, *10*, 177–183.
- [115] E. Thyryhaug, R. Tempelaar, M. J. P. Alcocer, K. Židek, D. Bína, J. Knoester, T. L. C. Jansen, D. Zigmantas, “Identification and characterization of diverse coherences in the Fenna-Matthews-Olson complex”, *Nature chemistry* **2018**, *10*, 780–786.
- [116] R. Tempelaar, T. L. C. Jansen, J. Knoester, “Vibrational beatings conceal evidence of electronic coherence in the FMO light-harvesting complex”, *The journal of physical chemistry. B* **2014**, *118*, 12865–12872.
- [117] E. Keil, H. Lokstein, R. Cogdell, J. Hauer, D. Zigmantas, E. Thyryhaug, “Light harvesting in purple bacteria does not rely on resonance fine-tuning in peripheral antenna complexes”, *Photosynthesis research* **2024**, *161*, 191–201.
- [118] D. J. Heijs, V. A. Malyshev, J. Knoester, “Thermal broadening of the J-band in disordered linear molecular aggregates: a theoretical study”, *Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 144507.
- [119] C. Curutchet, B. Mennucci, “Quantum Chemical Studies of Light-Harvesting”, *Chemical reviews* **2017**, *117*, 294–343.
- [120] S. J. Jang, B. Mennucci, “Delocalized excitons in natural light-harvesting complexes”, *Rev. Mod. Phys.* **2018**, *90*, 0350003–1 –035003–49.
- [121] U. Weiss, *Quantum dissipative systems*, **2022**.
- [122] N. Fukuchi, K. Nakamuras, Final Inspection Sheet - LCOS-SLM Serial No.: LSH0600826, (Hrsg.: Hamamatsu Photonics K.K. Solid State Division), **2013**.

Danksagung

Die Anfertigung dieser Dissertation wurde von vielen Menschen auf unterschiedliche Weise begleitet und unterstützt. Für die fachliche, organisatorische und persönliche Hilfe möchte ich mich im Folgenden herzlich bedanken.

Zuallererst möchte ich dir, lieber Jürgen, für deine kontinuierliche Unterstützung, deine wertvollen Anregungen und dein stetiges Vertrauen in meine Arbeit danken. Die Möglichkeit, meine Dissertation an deinem Lehrstuhl durchführen zu dürfen und mich dabei fachlich wie persönlich weiterzuentwickeln, weiß ich sehr zu schätzen. Deine fachliche Expertise und deine motivierende Art haben maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem dir, Richard. Mit meiner Bachelorarbeit in deiner Arbeitsgruppe bin ich vor inzwischen zehn Jahren in die experimentelle Forschung und an Jürgens Lehrstuhl gekommen und konnte mein Wissen und meine Fähigkeiten im Rahmen meiner Masterarbeit weiter vertiefen. Umso größer war für mich der Anreiz, mit meiner Dissertation bei Jürgen ein Forschungsthema weiterzuverfolgen, das du bereits während deiner Zeit in Spanien angestoßen hast. Deine Unterstützung aus der nordwesteuropäischen Ferne hat mir in vielen Situationen geholfen, insbesondere bei Rückschlägen und Gegenwind nicht den Mut zu verlieren.

Ich danke außerdem meinen Mentoren Prof. Dr. Stephan Kümmel sowie Prof. Dr. Markus Lippitz, der zudem die Zweitkorrektur meiner Arbeit übernommen hat.

I would like to express my sincere thanks to Dmitry Pestov for his valuable technical support and expertise regarding the MIIPS HD Shaper. I am particularly grateful for his direct involvement in the repair of the MDU unit, which he personally carried out in the United States. His commitment, technical skill, and willingness to provide hands-on support were greatly appreciated.

Meinem Lehrstuhl *Spektroskopie weicher Materie* (SsM) danke ich sehr herzlich. Ein besonderer Dank gilt den Technikern sowie der Sekretärin des Lehrstuhls, deren engagierte

und zuverlässige Arbeit eine unverzichtbare Grundlage für den täglichen Forschungs- und Lehrbetrieb darstellt. Liebe Michaela Düngfelder, vielen Dank für deine Hilfe im Bürokratie-Wirrwarr der Universität und deine stetige Unterstützung im Universitätsalltag. Vielen Dank auch an Werner Reichstein und Stefan Schlicht für euren unermüdlichen Einsatz in den Laboren, die kleinen und großen Reparaturen am Laborequipment sowie die technischen Lösungen zur Umsetzung der Experimente. Ihr seid das Rückgrat des Lehrstuhls.

Danke auch an alle (ehemaligen) Mitstreiter am Lehrstuhl. Dominic Raithel und Bernd Wittmann, vielen Dank für eure Betreuung während meiner Bachelor- und Masterarbeit – ihr habt meinen wissenschaftlichen Arbeitsstil nachhaltig geprägt. Danke dir, Inga Elvers, für das mehrfache Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für deine ehrliche Meinung und Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt meinem Laborpartner Paul Recknagel. Danke für die hervorragende Zusammenarbeit, deine Hilfe beim Umgang mit LH2-Komplexen und die zahlreichen Diskussionen der Messergebnisse. Mein Dank gilt außerdem allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für die wertvollen Gespräche und die schöne gemeinsame Zeit bei Kaffeepausen, Weihnachtsfeiern und Ausflügen: Uwe Gerken, Michael Heimler, Peter Hagen, Lisa Günter, Stefan Goppelt, Kevin Wilma, Sebastian Stäter, Daniel Zalami, Heyou Zhang, Andrea Albert, Patrick Beer, Max Gießübel, Julia Hustler und Michael Philipp.

Ich danke meinem gesamten Freundeskreis für all die Stunden, in denen ihr mich aus meiner Uni-Bubble geholt habt, für die Ablenkung vom Promotionsalltag und für eure aufmunternden Worte, wenn einmal nichts so laufen wollte, wie ich es mir vorgestellt hatte. Ein besonderer Dank gilt den Fußballern und Keglern des SC Glückauf Auerbach – wenn schon die Zukunft des Vereins ungewiss ist, soll er zumindest in dieser Danksagung verewigt sein – für die gemeinsamen Trainings, Spiele und die feucht-fröhlichen Mannschaftsabende. Vielen Dank auch an Tobias und Teresa für die zahlreichen Volleyball- und Boulder-Sessions, in denen ich abschalten und mich vollständig auspowern konnte. Ihr habt mir immer wieder gezeigt, dass es ein Leben neben der universitären Arbeit gibt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Verwandten. Florian und Matthias, danke, dass ihr mich ausgehalten habt, auch wenn ich während der Promotionszeit bestimmt nicht immer der angenehmste Bruder war, und ihr dennoch stets hinter mir gestanden habt. Mama und Papa, danke für eure Unterstützung über all die Jahre hinweg. In allen Situationen meines bisherigen Lebenswegs konnte ich mich immer auf euren Rückhalt verlassen.

Zu guter Letzt möchte ich auch den Menschen in meiner Familie danken, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben konnten. Diese Arbeit soll daher in stillem Gedenken jenen Familienmitgliedern gewidmet sein, die mich zu ihren Lebzeiten stets unterstützt haben und die ich selbst nur viel zu kurz oder nicht mehr persönlich kennenlernen durfte:

Maria & Johann Wiesneth

Albert Wiesneth

Anni & Max Dornisch

Margarete Dobmeier

Roland Dobmeier

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Außerdem erkläre ich mich einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Prüfung unterzogen werden kann.

Des Weiteren erkläre ich mich einverstanden, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Ort, Datum

Stephan Wiesneth